

**Die Wirkung von Basenanaloga
und UV-B-Bestrahlung auf die Induktion
der Blütenbildung bei der Langtagpflanze
Hyoscyamus niger L.**

Helga Hofmann



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die Wirkung von Basenanaloga und UV-B-Strahlung
auf die Induktion der Blütenbildung bei der
Langtagpflanze Hyoscyamus niger L.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Helga Hofmann
aus München

März 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 1987

Verwendete Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
Butyl-PBD	2-(4-t-Butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,2,3-oxodiazol
cpm	counts per minute
DEP	Diethylpyrocarbonat
DL	Dauerlicht
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EtSH	Mercaptoethanol
5-FU	5-Fluoruracil
IEF	Isoelektrische Fokussierung
KT	Kurztag
LT	Langtag
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PPO	2,5-Diphenyloxazol
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
2-TU	2-Thiouracil
Upm	Umdrehungen pro Minute

GLIEDERUNG

	Seite:
I. Einleitung	1
II. Material und allgemeine Methoden	9
II. 1. Pflanzenmaterial	9
II. 1.1. Anzucht	9
II. 1.2. Auswertung der Versuchspflanzen auf Blütenbildung	10
II. 2. Methoden	10
II. 2.1. Blattmaterial	10
II. 2.2. Extraktion der Gesamt-RNA aus Blättern...	10
II. 2.3. Gewinnung der Poly(A)-RNA	12
II. 2.4. In vitro-Translation	13
II. 2.5. Auftrennung der Translationsprodukte mittels Gel-Elektrophorese	14
II. 2.5.1. Isoelektrische Fokussierung	15
II. 2.5.2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	16
II. 2.5.3. Fluorographie	18
II. 2.6. Hemmung von Nuklease-Aktivität	19
II. 3. Statistik	19
III. Untersuchungen über die Beteiligung eines Blühhemmstoffs	21
III. 1. Auslösung der Blütenbildung durch Totalent- blätterung	21
III. 1.1. Versuchsdurchführung	21
III. 1.2. Ergebnisse	22

III. 2. Auslösung der Blütenbildung durch 2-Thiouracil (2-TU)....	24
III. 2.1. Infiltration der Pflanzen	24
III. 2.2. Ergebnisse	25
III. 2.2.1. Induktion der Blütenbildung durch 2-TU und Revertierbarkeit durch Uracil	25
III. 2.2.2. Einbau von 2-TU in die RNA	27
III. 2.2.3. Einfluß von 2-TU auf den RNA-Stoffwech- sel im Blatt	31
III. 2.2.3.1. Gesamt-RNA	32
III. 2.2.3.2. Poly(A)-RNA	34
III. 2.2.3.3. Translationsaktivität	36
III. 2.2.4. Veränderungen in der Zusammensetzung der in vitro-Translationsprodukte	40
III. 3. Diskussion	53
IV. Einfluß von UV-B-Strahlung auf <i>Hyoscyamus niger</i> im Zusammen- hang mit der Blühinduktion	60
IV. 1. Bestrahlungseinrichtungen und Strahlungsmessung	61
IV. 2. Einfluß von UV-B auf die Induktion der Blütenbildung	65
IV. 2.1. Belichtungsanordnung	65
IV. 2.2. Ergebnisse	66
IV. 2.2.1. UV-B vor, während und nach induktivem Dauer-Weißlicht	66
IV. 2.2.2. Abhängigkeit von der UV-B-Bestrahlungs- stärke	68
IV. 3. Einfluß auf die Blattpigmente	70
IV. 3.1. Chlorophylle und Carotinoide	70
IV. 3.2. Anthocyane	74
IV. 3.3. Andere Flavonoide	76

	Seite:
IV. 4. Einfluß auf den Proteingehalt der Blätter	78
IV. 5. Einfluß auf den RNA-Gehalt der Blätter	80
IV. 5.1. Gesamt-RNA	81
IV. 5.2. Poly(A)-RNA	82
IV. 5.3. Translationsaktivität	84
IV. 6. Veränderungen in der Zusammensetzung der in vitro- Translationsprodukte	86
IV. 7. Diskussion	90
V. Zusammenfassung	96
VI. Literaturverzeichnis	100

I. EINLEITUNG

Jede Pflanze durchläuft in ihrem Lebenszyklus nacheinander eine vegetative Phase des Wachstums und der Reservestoffspeicherung und eine reproduktive Phase mit der Entwicklung von Blüten sowie der Frucht- und Samenbildung. Die Ausbildung generativer Organe, die der Erhaltung und Verbreitung der Art dient, ist in ihrem Zeitpunkt - bedingt durch fortwährenden Selektionsdruck - den bestehenden Umweltbedingungen optimal angepaßt.

Bei vielen Pflanzen wird der Übergang zur Fortpflanzungsphase durch die Tageslänge bestimmt. GARNER und ALLARD (1920) beschrieben dieses Phänomen erstmals und führten für die Abhängigkeit entwicklungsphysiologischer Vorgänge von der relativen Tag- oder Nachtlänge den Begriff "Photoperiodismus" ein. Ähnlich wie die Blütenbildung erwiesen sich im Laufe der Zeit noch zahlreiche andere Entwicklungsvorgänge sowohl im Pflanzen- wie im Tierreich als photoperiodisch gesteuert, etwa der herbstliche Laubfall (Lit.bei BÜNNING, 1963), die Ausbildung von Wurzelknollen bei *Begonia evansiana* (ESASHI, 1966), die Monosporenbildung bei *Porphyratenera* (RENTSCHLER, 1967), die Oviparie bei einigen viviparen Insekten (LEES, 1966) oder die Keimdrüsentätigkeit einiger Vögel und Säugetiere, um nur ein paar Beispiele zu nennen.

Aufgrund der Beobachtung, daß die Blütenbildung bei einigen Pflanzen durch eine Verlängerung, bei anderen durch eine Verkürzung der täglichen Lichtperiode gefördert wird, wurde eine Einteilung in die sich gegensätzlich verhaltenden Haupttypen Langtag(LT)- und Kurztag(KT)-Pflanzen getroffen (GARNER und ALLARD, 1925). Die Reaktion der Pflanzen kann so ausgeprägt sein, daß bei den sog. qualitativen LT-Pflanzen eine Blütenbildung unterhalb einer spezifischen, kritischen Tageslänge, bei KT-Pflanzen entsprechend oberhalb, nicht mehr stattfindet.

Die Wahrnehmung der Lichtperiode erfolgt dabei in den Blättern; ein allein der entsprechenden Tageslänge ausgesetzter Vegetationskegel zeigt keine Reaktion (KNOTT, 1934). Da mit kurzen Lichtgaben in der Mitte der Dunkelperioden ("Störlicht") je nach Reaktionstyp der Versuchspflanze Blütenbildung angeregt oder unterdrückt werden kann (Zusammenfassung bei BÜNNING, 1963), konnten mit Hilfe solcher "Störlicht"-Gaben Wirkungsspektren für die photoperiodische Induktion erarbeitet werden. Wirkungsmaxima bei Wellenlängen um 660 nm, Revertierbarkeit durch darauffolgendes dunkelrotes Licht (730 nm) sowie der geringe Energiebedarf beider Reaktionen legen nahe, daß das Phytochromsystem als Photorezeptor eine entscheidende Rolle spielt (PARKER et al., 1946, 1949; BORTHWICK et al., 1952). Eine "Hochenergiereaktion", wie sie für eine Reihe anderer photomorphogenetischer Vorgänge bekannt geworden ist, ist für die Blütenbildung umstritten. Während einige Autoren berichteten, daß bei einer Langzeitbestrahlung mit monochromatischem Licht nicht Hellrot, sondern Blau und Dunkelrot einen LT-Effekt bewirkten (STOLWIJK und ZEEVART, 1955; MEIJER, 1957), konnte dies von WARM (1977) an Hyoscyamus nicht bestätigt werden. Auch photosynthetische Prozesse scheinen - auf allerdings noch ungeklärte Weise - an der Blüteninduktion beteiligt zu sein (SCHNEIDER und STIMSON, 1972; WARM, 1977).

Blühhormon oder Blühhemmstoff ?

Die Reaktion auf die in den Blättern wahrgenommene induktive Tageslänge erfolgt im Vegetationskegel, der auf eine Produktion von Blütenanlagen "umschaltet". Diese räumliche Trennung von reizaufnehmendem und -beantwortendem Organ ließ CHAILAKHYAN 1936 ein Blühhormon postulieren; er nannte es "Florigen".

Zahlreiche Versuche bestätigten den stofflichen Charakter des Blühstimulus. Am überzeugendsten ist dabei nach wie vor, daß eine erfolgte Induktion durch Pfropfung von Pflanze zu Pflanze übertragbar ist (Lit. bei VINCE-PRUE, 1975). Diese Übertragung ist auch zwischen verschiedenen Pflanzensorten möglich, sogar zwischen LT- und KT-Pflanzen, was die universelle Natur des Blühhormons belegt. Trotz vielfacher Bemühungen konnte die

gesuchte Substanz jedoch bis heute noch nicht isoliert werden. CLELAND (1974) glaubte, in Salicylsäure das "Florigen" gefunden zu haben, andere sahen es in Acetylcholin (KANDELER, 1972) oder Östrogenen (KOPCEWICZ, 1972). Für keine der Substanzen aber ließ sich die Identität mit dem postulierten Hormon bestätigen.

VON DENFFER äußerte 1950 als erster den Gedanken, es handle sich möglicherweise bei der Induktion der Blütenbildung gar nicht um ein aktives Prinzip, sondern vielmehr um die Beseitigung eines spezifischen Hemmstoffs, der den Vegetationskegel unter nicht-induktiven Bedingungen an der Ausbildung von Blütenanlagen hindere. Auch diese "Hemmstoff-Hypothese" fand in einer Reihe von Versuchsergebnissen ihre Unterstützung. So führten Totalentblätterungen, bei denen ein in den Blättern gebildeter Hemmstoff mit diesen entfernt wurde, bei einigen wenigen KT- und LT-Pflanzen auch unter nichtinduzierenden Tageslängen zu einer Entwicklung von Blütenanlagen. Allerdings waren bisher auch alle Bemühungen, diesen Hemmstoff zu isolieren, erfolglos.

WELLENSIEK (1970) stellte schließlich eine Kombination der beiden so gegensätzlich erscheinenden Hypothesen zur Diskussion: erst, wenn ein zunächst vorhandener Hemmstoff durch photoperiodische Induktion entfernt werde, könne in den Blättern ein transportierbarer Blühstimulus synthetisiert werden.

VINCE-PRUE (1975) hält ebenfalls einen simplen Inhibitor-Mechanismus für unwahrscheinlich: "It seems likely that the process of flowering is regulated by more than one transmissible substance that influences evocation at the apex." Versuche mit teilinduzierten Pflanzen weisen darauf hin, daß nicht-induzierte Blätter einen Inhibitor exportieren, induzierte Blätter dagegen ein Florigen, und die Konkurrenz der beiden Substanzen am Apex als Rezeptorort über eine Blühinduktion entscheidet.

Unabhängig von der biochemischen Natur des Florigens oder Hemmstoffs ist auch die Frage nach den Prozessen, die zwischen Induktion und Realisation ablaufen, bis heute unbeantwortet.

In den letzten Jahren sind in diesem Zusammenhang zahlreiche Untersuchungen des Nukleinsäuresystems durchgeführt worden. Die morphologischen Differenzierungen, die durch eine photoperiodische Induktion ausgelöst werden, legen spezifische Veränderungen der Genfunktion nahe, die mit einer stadienspezifischen mRNA- und Proteinsynthese einhergehen. Tatsächlich ließ sich sowohl bei verschiedenen LT- wie auch KT-Pflanzen eine Blütenbildung durch Anwendung von Basenanaloga und anderen Hemmstoffen des Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsels unterbinden (HESLOP-HARRISON, 1960; ZEEVART, 1962; EVANS, 1964; TELTSCHEROVA, 1967; weitere Lit. siehe ROSS, 1970). Bei einigen LT-Pflanzen aber hatten Antimetaboliten überraschend eine gegenteilige Wirkung: HIRONO und REDEI (1966) erreichten z.B. mit verschiedenen Derivaten von DNA-Bausteinen sowie mit 8-Azaadenin bei *Arabidopsis thaliana* eine deutliche Beschleunigung der Blütenbildung, FEIERABEND und BÜNSOW (1967) gelang mit Chloramphenicol eine Stimulierung der Blütenbildung bei unvollständig vernalisiertem Winterroggen. EICHHOFF und RAU (1969) fanden bei *Hyoscyamus niger* sogar zwei verschiedene Reaktionsmöglichkeiten auf ein und dieselbe Substanz: eine 2-Thiouracillösung, die direkt auf den Vegetationskegel appliziert wurde, hemmte die photoperiodische Induktion der Blütenbildung; wurde das Basenanalogon jedoch den Blättern verabreicht, kamen die Pflanzen auch unter nicht-induktiven Lichtverhältnissen zum Blühen.

Eine Behandlung von *Hyoscyamus* mit Cycloheximid, einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese, brachte analoge Resultate (KLAUTKE und RAU, 1973).

In den letzten Jahren wurde vereinzelt versucht, durch photoperiodische Induktion bedingte Veränderungen in der Zusammensetzung von Nukleinsäuren und Proteinen nachzuweisen.

Daß bei der Umsteuerung am Vegetationspunkt Änderungen im Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel beteiligt sind, darf als bewiesen gelten (JACQMARD et al., 1975; BERNIER, 1981, 1986).

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zur Lösung der Frage liefern, ob und in welchem Maß dies auch für den Induktionsmechanismus auf der Ebene des Blattes gilt. Erste starke Hinweise dafür erhielt WARM (1984), der nach Induktion mit Dauerlicht bei *Hyoscyamus* **spezifische** Veränderungen in der Zusammensetzung der Blatt-mRNA fand. Weil die Pflanzen dabei einer erhöhten Lichteinwirkung ausgesetzt sind, könnten einige dieser Veränderungen durch eine gesteigerte Stoffwechselrate bedingt sein. Bei einer Chemoinduktion mit 2-Thiouracil erhalten die Pflanzen dagegen genau die gleiche Tageslänge und Lichtmenge wie die vegetativen Kontrollen. Untersuchungen solcherart induzierter Pflanzen schienen deshalb geeigneter, Aufschlüsse über die unmittelbaren Zusammenhänge des Nukleinsäurestoffwechsels mit der Blütenbildung zu erhalten.

Die Wirkung von UV-Strahlung auf pflanzliche Entwicklungsprozesse

Die Sonne emittiert das gesamte Spektrum elektromagnetischer Wellen, von Radiowellen über das sichtbare Licht bis hin zu den extrem kurzwelligen Röntgen- und γ -Strahlen. Die für die Organismen schädlichen kurzwelligen Bereiche des Spektrums erreichen jedoch nicht die Erdoberfläche, sondern werden in der oberen Atmosphäre absorbiert. Ein wirksamer Schutz gegen die kurzwellige UV-Strahlung ist dabei in erster Linie durch die stratosphärische Ozonschicht in 10-50 km Höhe gegeben.

Nach der Nomenklatur von LOCKHARD und BRODFÜHRER-FRANZGROTE (1961) wird der ultraviolette Anteil des Sonnenlichts in vier Kategorien unterteilt:

UV-A	400-320 nm
UV-B	320-280 nm
UV-C	280-200 nm
extremes UV	<200 nm

Die Erdoberfläche wird jedoch nur von UV-A- und UV-B-Strahlung erreicht, deren Anteil zusammen etwa 12 % der Strahlung des sichtbaren Spektrums beträgt (SCHULZE, 1977). Die kürzeste bisher im Hochgebirge gemessene

Wellenlänge betrug 278,4 nm (GÖTZ und CASPARIS, 1943), während das Spektrum in normalen Meereshöhen nur bis zu etwa 295 nm reicht.

Die Strahlungsverhältnisse auf der Erdoberfläche könnten sich aber in naher Zukunft erheblich ändern. Seit einigen Jahren wird vermutet, daß sich die schützende Ozonschicht aufgrund der zunehmenden Umweltbelastung durch anthropogene Aktivitäten verringert. Gefahr droht dabei vor allem durch chlorierte Fluorkohlenwasserstoffe (MOLINA and ROWLAND, 1974), die als Treibgase in Spraydosen sowie als Schäumungs- und Kältemittel in großer Menge Verwendung finden. Wegen ihrer chemischen Stabilität sind sie besonders langlebig und gelangen allmählich bis in die Stratosphäre, wo sie durch die Wirkung kurzweiliger UV-Strahlung ($\lambda < 220$ nm) gespalten werden können. Die dabei entstehenden Chlor-Radikale greifen katalytisch in die natürlichen ozonabbauenden Vorgänge ein und beeinflussen so das Gleichgewicht des Ozonauf- und -abbaus. Auf die gleiche Weise tragen neben den halogenierten Kohlenwasserstoffen auch Stickoxide, die aus Verbrennungsprozessen stammen, zur Reduktion der Ozonschicht bei (GROBECKER et al., 1974).

Eine große natürliche Schwankungsbreite sowie eine Vielzahl schwer kalkulierbarer Einflüsse auf die Ozonchemie erschweren jedoch präzise Vorhersagen über zu erwartende Veränderungen der Ozonschicht. Neben jahreszeitlichen Schwankungen und der Abhängigkeit von der geographischen Breite beeinflussen zum Beispiel die rhythmischen Sonnenfleckensaktivitäten die Ozonkonzentration ebenso wie temporäre und lokale Erwärmungen und Abkühlungen in der Stratosphäre (PAETZOLD, 1973; ATTMANNSPACHER, 1981). Dennoch kann man aufgrund der bisherigen Messungen und theoretischer Modellrechnungen von einem Trend zu einer Ozonabnahme ausgehen. Neuere Berechnungen, die Wirtschaftsprognosen für die Immission von Schadgasen ebenso wie die bekannten Reaktionen in der Stratosphäre berücksichtigen, lassen auf einen zu erwartenden Ozonabbau zwischen 5 und 10 % schließen (NAS, 1982).

Eine Verringerung der Ozonschicht würde speziell zu einer Zunahme der UV-B-Strahlung führen; Strahlung des UV-C-Bereichs würde selbst bei

einer Ozonreduktion von 90 % die Erdoberfläche nicht erreichen, während oberhalb von 330 nm der Absorptionskoeffizient von Ozon gleich null ist, d.h. UV-A-Strahlung von Ozon praktisch nicht beeinflusst wird. Im UV-B-Bereich wäre jedoch, bedingt durch die Wellenlängenabhängigkeit der Ozonabsorption, der Anstieg relativ stärker bei kürzeren Wellenlängen. Außerdem wäre eine Verschiebung des die Erdoberfläche erreichenden UV-Spektrums um einige Nanometer zu kürzeren Wellenlängen zu erwarten. Obwohl UV-A über 90 % der UV-Globalstrahlung ausmacht, hat es sich für die Auslösung photochemischer Reaktionen in biologischen Systemen als weit weniger wirksam erwiesen als UV-B (CALDWELL, 1968; 1971). Die Wirkungsspektren für die DNA-Schädigung von Mikroorganismen (SETLOW, 1974) wie für die sog. "allgemeine Pflanzenwirksamkeit" (CALDWELL, 1971) zeigen übereinstimmend, daß die beobachtbaren UV-B-Effekte am stärksten bei Wellenlängen um oder unter 300 nm auftreten, also gerade in dem Spektralbereich, in dem sich auch Ozonveränderungen am stärksten auswirken.

Die Wirkung der UV-Strahlung beruht darauf, daß die Photonen von bestimmten Substanzen absorbiert werden und in ihnen eine Vielzahl photochemischer Reaktionen auslösen, wodurch diese ihre biologische Funktion verlieren können. Besonders Nukleinsäuren, Proteine und einige Phytohormone weisen im UV-B-Bereich eine intensive Absorption auf. So wurde an *Rumex patientia* eine Beeinträchtigung des Blattflächenwachstums durch UV-B beobachtet, die auf eine Herabsetzung der Zellteilungsrate zurückzuführen ist (DICKSON und CALDWELL, 1978). Von einer Unterdrückung der Keimungsrate durch UV-B wurde ebenso berichtet wie von einer Beeinträchtigung der Photosynthese oder einer Verminderung des Frischgewichts der Pflanzen (Literaturübersicht bei TEVINI und IWANZIK, 1982). BIGGS und KOSSUTH (1978) stellten an verschiedenen Nutzpflanzen sogar eine Reduktion der Gesamtbiomasse von bis zu 50 % durch UV-B-Strahlung fest.

Es müssen jedoch nicht alle Moleküle, die UV-B-Strahlung absorbieren, zwangsläufig dadurch zerstört werden. Gewöhnlich in Oberflächenschichten von Blättern lokalisierte Phenylpropanpigmente (Flavonoide, Anthocyane)

oder auch Carotinoide können als Schutzpigmente für die Zelle fungieren. Eine Anreicherung der hydrophilen Pigmente unter UV-B-Strahlung wurde in der Tat mehrfach beobachtet und als aktiver Schutzmechanismus der Pflanze gedeutet (siehe WELLMANN, 1983).

Über einen Einfluß von UV-B auf die photoperiodische Induktion der Blütenbildung ist aus der Literatur nichts bekannt. Eine globale oder regionale Zunahme der auf die Erdoberfläche auftreffenden UV-B-Strahlung könnte aber gerade in diesem Zusammenhang weitreichende Folgen haben. Durch die evolutive Entwicklung fällt für jede Pflanzenart der Übergang zur reproduktiven Phase auf den für ihre Fortpflanzungschance bestgeeignetsten Zeitpunkt in der Vegetationsperiode. Die tageslängenabhängige Blütenbildung gewährleistet zum Beispiel, daß geeignete tierische Bestäuber anwesend sind oder daß die Pflanze ausreichende Reserven hat, um lebensfähige Samen hervorbringen zu können. Folglich könnte eine Störung der bewährten Reaktion der Pflanze auf induktive Lichtbedingungen das Überleben einer Pflanzenart gefährden oder zumindest eine gravierende ökologische Benachteiligung mit sich bringen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, zu klären, ob und in welchem Umfang die photoperiodisch induzierte Blütenbildung von *Hyoscyamus niger* durch UV-B-Strahlung beeinflusst wird, sowie mögliche Zusammenhänge mit dem Nukleinsäurestoffwechsel und der Proteinbiosynthese zu untersuchen.

II. MATERIAL UND ALLGEMEINE METHODEN

II. 1. Pflanzenmaterial

II. 1.1. Anzucht

Für alle Versuche wurden Pflanzen der einjährigen, gelbblühenden Rasse von *Hyoscyamus niger* L. (Bilsenkraut, Solanaceae) verwendet.

Das Samenmaterial ist 1937 von MELCHERS in München isoliert worden und wird seither durch ständige Selbstbestäubung der Pflanzen gewonnen.

Die Samen keimten in Vermiculit oder gesiebter Gartenerde. Nach etwa 14 Tagen wurden die Schößlinge in Anzuchtschalen pikiert, nach weiteren 4-5 Wochen einzeln in Tontöpfe versetzt. Die Pflanzen blieben im Gewächshaus, bis sie im Alter von 3-4 Monaten für einen Versuch verwendet wurden. Die Temperatur im Gewächshaus sank auch in der Nacht nicht unter 18-20°C.

Hyoscyamus niger ist eine qualitative Langtagpflanze mit einer kritischen Tageslänge von 11 Stunden. Unter Kurztagbedingungen bleibt sie zeit ihres Lebens strikt vegetativ, geht schließlich nach etwa einem Jahr zugrunde, ohne je geblüht zu haben. Durch Abdecken mit Dunkelstürzen wurde für die Versuchspflanzen die tägliche Lichtperiode auf 8-10 Stunden begrenzt. Während der Wintermonate wurde das Tageslicht durch Glühlampen (Philips "Comptalux", 300 W) ergänzt und so eine Beleuchtungsstärke von mindestens 3000-5000 Lux eingestellt.

Von Zeit zu Zeit mußten auftretende Pflanzenschädlinge mit Insektiziden (Metasystox, Rospin) bekämpft werden. 2 Wochen vor Beginn eines Versuchs und bis zu dessen Auswertung unterblieb jedoch jede chemische Schädlingsbekämpfung.

II. 1.2. Auswertung der Versuchspflanzen auf Blütenbildung

6 Wochen nach Versuchsbeginn wurden die Pflanzen auf Blütenanlagen hin untersucht. Eine Pflanze wurde als "blühend" gewertet, wenn der Vegetationspunkt Blütenprimordien ausdifferenziert hatte, die unter dem Präpariermikroskop deutlich erkennbar waren. Außerdem wurde der Blattzuwachs, d.h. die Anzahl der nach Versuchsbeginn gebildeten Blätter, bestimmt. Dieser Blattzuwachs ist nach LANG und MELCHERS (1943) bei *Hyoscyamus* ein Maß für die Stärke der Blühinduktion: je geringer die Zahl der bis zur ersten Blütenanlage gebildeten Blätter ist, umso stärker war die Induktion.

II. 2. Methoden

II. 2.1. Blattmaterial

Um die unvermeidbare biologische Variabilität soweit als möglich einzuschränken, wurden für alle Extraktionen die jeweils jüngsten schon voll entwickelten Blätter der Versuchspflanzen geerntet, und zwar nach Zufallsauswahl aus der gesamten Pflanzencharge. Für eine RNA-Extraktion wurden z.B. etwa 12-15 Blätter benötigt. Die bei *Hyoscyamus* recht kräftig ausgebildeten Mittelrippen wurden entfernt, die Blätter in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

II. 2.2. Extraktion der Gesamt-RNA aus Blättern

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte nach der von HALL et al. (1978) beschriebenen sog. "SDS-Proteinase K-Methode".

Jeweils 5 g Blattmaterial wurden mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser pulverisiert und dann in 13 ml auf 100°C erhitzten Extraktionspuffer (0,2 M Natriumborat, pH 9,0, 1 % (w/v) SDS, 30 mM EGTA, 5 mM DTT) aufgenommen. Das Gemisch wurde durch zweiminütiges kräftiges Reiben homogenisiert und durch autoklaviertes Miracloth (Calbiochem) abgepreßt. Nach Zusatz von 6,5 mg Proteinase K (Merck) je Probe wurden die Ansätze 60 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Durch Zugabe von 1 ml 2 M KCl wurde das bei den folgenden Fällungsschritten störende SDS im Eisbad ausgefällt und abzentrifugiert (10 min, 10 000 Upm, Beckman Rotor JA 20). Aus dem Überstand wurde durch Zuzufügen von 0,25 Vol. 12 M LiCl die RNA über Nacht bei 4°C ausgefällt. DNA sowie die niedermolekulare t-RNA bleiben unter diesen Bedingungen in Lösung.

Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und mehrmals mit 2 M LiCl gewaschen (Zentrifugationen jeweils wie oben). Schließlich wurde das Pellet in 3 ml 20 % (w/v) K-Acetat, pH 5,5 aufgenommen und durch Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol (p.A.) die RNA über Nacht bei -20°C erneut ausgefällt. Da dabei auch Polysaccharide präzipitieren, erwies sich vor der Isolierung der Poly(A)-RNA aus der Gesamt-RNA-Präparation ein weiterer Reinigungsschritt als vorteilhaft, bei dem ein Großteil der Polysaccharide über eine Cellulose-Säule entfernt wurden (MOZER, 1980). Dazu wurde die Ethanol-Fällung 20 min bei 10 000 Upm abzentrifugiert, das Pellet vakuumgetrocknet und in 4 ml sog. EB-Puffer ("elution buffer" nach AVIV und LEDER, 1972: 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS) aufgenommen. Durch kurzes Erhitzen in einem kochenden Wasserbad und anschließendem schnellem Abkühlen im Eisbad wurden Hybridbindungen gelöst.

Eine autoklavierte Polypropylen-Säule (Bio-Rad) wurde mit 200 mg mikrokristalliner Cellulose (Sigmacell Typ 50, Sigma) gefüllt und durch folgende Waschschrirte vorbereitet:

30 ml $H_2O_{dest.}$ mit 0,05 % (v/v) DEP

20 ml 0,1 M NaOH

30 ml EB-Puffer

20 ml BB-Puffer ("binding buffer": EB-Puffer mit 0,5 M NaCl)

Die RNA-Lösung wurde durch Zugabe von 1 ml 2,5 M NaCl auf eine NaCl-Konzentration von 0,5 M gebracht und auf die Säule aufgetragen. Bei dieser erhöhten Salzkonzentration binden Polysaccharide an die Cellulose, während RNA in Lösung bleibt. Aus dem Säulendurchfluß konnte nun entweder direkt die Poly(A)-haltige RNA isoliert werden oder

die nun gereinigte RNA wurde durch Zufügen von 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat und 2,5 Vol. Ethanol (p.A.) bei -20°C erneut ausgefällt und aufbewahrt.

II. 2.3. Gewinnung Poly(A)-haltiger RNA

Zur Isolierung Poly(A)-haltiger RNA aus der gewonnenen Gesamt-RNA wurde das von AVIV und LEDER (1972) beschriebene Verfahren der Adsorptionschromatographie an einer Oligo-dT-Cellulose-Säule gewählt.

Eine Econo-Column (Bio-Rad) wurde mit 200 mg Oligo-dT-Cellulose (Sigma) bestückt und durch dieselben Waschschrirte wie unter II.2.2. beschrieben auf die Auftrennung der RNA vorbereitet. Aus einem Aliquot der Gesamt-RNA-Lösung wurde deren Menge durch Extinktionsmessung bei 260 nm bestimmt (Beckman Model 24 Spectrophotometer). Eine Extinktionseinheit entspricht dabei 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Das Verhältnis $A_{260} : A_{280}$ diene als Maß für die Reinheit der RNA-Präparation.

Die in BB gelöste RNA wurde zweimal über die Säule geschickt und mit 10 ml BB nachgewaschen. Bei dessen hoher Salzkonzentration hybridisieren Poly(A)-Sequenzen der RNA mit den Oligo-dT-Sequenzen des Säulenmaterials. Mit 4 ml des salzärmeren EB wurde sodann die gebundene RNA wieder eluiert.

Um eine möglichst vollständige Trennung der RNA-Spezies zu erreichen, wurde der Auftrennungsprozeß mit dem Eluat wiederholt, nachdem die Säule durch Waschen mit 20 ml 0,1 M NaOH, 30 ml EB und 20 ml BB regeneriert worden war. Nach erneuter Erhöhung der Salzkonzentration der RNA-Lösung vor dem Säulenauftrag wurden alle Arbeitsschritte, wie oben beschrieben, wiederholt. Die Eluierung der Poly(A)-haltigen RNA erfolgte diesmal jedoch in 4 Fraktionen zu je 1 ml EB .

Während der gesamten Auftrennung wurde die Durchflußgeschwindigkeit der Säule auf 15-20 Tropfen/min eingestellt.

Nach erneuter Regenerierung konnte das Säulenmaterial noch mehrmals verwendet bzw. bei -20°C gelagert werden.

Von Zeit zu Zeit wurden die Bindungseigenschaften der Oligo-dT-Cellulose durch Auftragung einer reinen Polyadenylsäurelösung (Boehringer) getestet. Noch nach 14 Trennungsgängen wurden von den eingesetzten 100 µg Polyadenylsäure nur 6 % bereits vor der Erniedrigung der Salzkonzentration eluiert, 90 % traten in der ersten 1 ml-EB-Fraktion auf.

Zur quantitativen Bestimmung der Poly(A)-RNA wurde von allen EB-Fraktionen sowie der im Anschluß daran aufgefangenen Waschlösung die Absorption bei 260 nm gemessen. Die jeweils 2 (oder 3) Fraktionen mit der höchsten Konzentration wurden vereinigt und daraus die RNA durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat und 2,5 Vol. Ethanol bei -20°C ausgefällt.

II. 2.4. In vitro-Translation

Bei der Auswahl unter den kommerziell erhältlichen Translationssystemen erwies sich das Kaninchen-Reticulocytenlysat von "New England Nuclear" als für unser System am besten geeignet. In der Handhabung des Lysats und der Durchführung der Versuche wurde den Hinweisen des Herstellers Folge geleistet. Dies entspricht weitgehend den Angaben von PELHAM und JACKSON (1976).

Die alkoholgefällte Poly(A)-RNA wurde nach Zentrifugation (20 min, 10 000 Upm, Beckman Rotor JA 20) einem weiteren Reinigungsschritt in 70 %igem Ethanol mit 0,5 % K-Acetat unterworfen, dabei zugleich in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach erneuter Zentrifugation (25 min, 12 000 Upm, Eppendorf Microfuge) und Vakuumtrocknung wurde die RNA mit sterilem Wasser (Ampuwa, Fresenius) auf eine Konzentration von 0,5 µg/µl gebracht.

Zur Durchführung einer zellfreien Proteinsynthese wurde folgende Testmischung erstellt:

250 µCi L-³⁵S-Methionin (Amersham, Braunschweig)
100 µl Reticulocytenlysat
20 µl 1 M K-Acetat
5 µl 0,05 M Mg-Acetat
55 µl "Translations-Cocktail"
Wasser ad 230 µl.

Der sog. "Cocktail" enthält alle für eine Translation erforderlichen Komponenten wie Spermidin, Creatinphosphat, Dithiothreitol und Guanosintriphosphat in HEPES-Puffer in optimierten Konzentrationen.

Zu jeweils 23 µl dieser Testmischung wurde 1 µg Poly(A)-RNA zugesetzt. Aufschluß über die endogene Proteinsynthese des Kaninchen-Systems lieferte ein Kontrollansatz ohne exogene mRNA. Zur Überprüfung der in vitro-Aktivität des Systems wurde bei jedem Versuch außerdem ein Ansatz mit nachweislich aktiver Hefe-mRNA (New England Nuclear) mitgeführt. Die Translation verlief bei 37°C und wurde nach 60 min durch Abkühlen auf 0°C abgebrochen.

Um den Einbau der radioaktiv markierten Aminosäure zu bestimmen, wurde jeweils mit einem Aliquot des Translationsansatzes eine TCA-Fällung der neu synthetisierten Proteine durchgeführt. Je 1 µl wurde dazu auf ein mit 10 % TCA vorbehandeltes Filterpapierplättchen (Schleicher & Schüll, Nr. 595) aufgetragen, getrocknet und nach MANS und NOVELLI (1961) mehrmals in TCA-Lösungen gewaschen. Für je 10 min kamen die Plättchen dabei in 10 % kalte, dann in 5 % kochende, schließlich in 5 % kalte TCA-Lösung, bevor sie in 96 % Ethanol gründlich nachgespült wurden. Dabei wurden noch ungebundenes ³⁵S-Methionin sowie ³⁵S-Methionin-tRNA entfernt, während die gefällten Proteine am Papier haften bleiben. Die quantitative Bestimmung des eingebauten ³⁵S-Methionins erfolgte in 5 ml Toluol-Scintillationscocktail (Toluol mit 0,7 % (w/v) Butyl-PBD) mit einer Fehlergenauigkeit von 2 % (Betascint BF 5001).

Der verbliebene Rest des Translationsansatzes wurde für weitere Analysen bei -20°C aufbewahrt.

II. 2.5. Auftrennung der Translationsprodukte mittels Gelelektrophorese

Die im Translationsgemisch enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Durch zweidimensionale Kombination einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) mit anschließender SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) ist das Auflösungsvermögen gegenüber der eindimensionalen Technik

um eine Größenordnung verbessert (O'FARRELL, 1975), was bei so komplexen Proteinmischungen wie den vorliegenden Translationsprodukten besonders vorteilhaft ist.

II. 2.5.1. Isoelektrische Fokussierung

Die IEF wurde in vertikalen Rundgelen durchgeführt. Dazu wurden Glasröhrchen von 16 cm Länge und 3 mm Innendurchmesser an ihrem unteren Ende mit Parafilm verschlossen. Zum Gießen von 10 Rundgelen wurde folgender Ansatz hergestellt:

5,5 g Harnstoff

1,33 ml 30 % Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid 28,4 : 1,6)
(beides Serva)

2,0 ml 10 % (v/v) Nonidet P-40 (Sigma)

0,4 ml Servalyt pH 5-7 (Serva)

0,1 ml Servalyt pH 3-10 (Serva)

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf 10 ml aufgefüllt.

Dies entspricht einer Acrylamidkonzentration von 4 %, wobei der Vernetzeranteil 5,6 % beträgt (in der Literatur übliche Schreibweise: T = 4 %, C = 5,6 %). Nach Lösen des Harnstoffs im handwarmen Wasserbad und Evakuieren der Lösung an der Wasserstrahlpumpe wurden 10 μl 10 % APS sowie 7 μl TEMED als Polymerisationsstarter zugesetzt. Mit Hilfe einer Spritze wurde die Lösung luftblasenfrei jeweils 12,5 cm hoch in die Glasröhrchen gefüllt und mit je 25 μl 8 M Harnstoff überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation (1-2 Stunden bei Raumtemperatur) wurde die Harnstofflösung durch 25 μl Probenpuffer A* ersetzt, der seinerseits noch mit 10 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ überschichtet wurde, um ein Auskristallisieren des Harnstoffs an der Oberfläche zu verhindern. (Probenpuffer A*: 9,5 M Harnstoff, 2 % (v/v) Nonidet P-40, 5 % (v/v) EtSH, 0,2 % SDS, 1,6 % (v/v) Servalyt pH 5-7, 0,4 % (v/v) Servalyt pH 3-10). Nach weiteren 1-2 Stunden wurden die Überstände über den Gelen wieder abgesaugt, der Parafilm entfernt und die Röhrchen in eine Disk-Elektrophorese-Trennkammer (DEA 90, WTW) eingesetzt. Die untere, anodische Pufferkammer enthielt 2 l 0,01 M H_3PO_4 (evakuiert, pH 11,6). Die Gelröhrchen wurden erneut mit 25 μl A*-Puffer beschickt, sodann mit Kathodenpuffer bis zum Rand gefüllt. Die Vor-

fokussierung der Gele erfolgte mit steigender Spannung: 15 min bei 200 V, 30 min bei 400 V und schließlich 30 min bei 600 V (LKB 2197 Power Supply). Die verschiedenen amphoteren Polyelektrolyte der Servalyt-Lösungen wandern dabei im elektrischen Feld, bis ihre Nettoladung gleich Null ist. Aufgrund ihrer großen Pufferkapazität geben sie dem umgebenden Gel ihren pH-Wert und bauen so einen relativ stabilen pH-Gradienten auf, in dem sich bei der Fokussierung die aufzutrennenden Proteine gemäß ihres isoelektrischen Punktes verteilen.

Nach erfolgter Vorfokussierung wurden die Überstände über den Gelen wieder entfernt, die Proben in A*-Puffer aufgetragen (jeweils 500 000 cpm) und mit 10 µl "sample overlay" (9 M Harnstoff, 2 % Servalyt pH 5-7, 0,5 % Servalyt pH 3-10) überschichtet. Sodann wurden sie über Nacht (15-16 Stunden) bei 600 V fokussiert, anschließend eine weitere Stunde bei 1000 V. Nach beendeter Fokussierung wurden die Gele mittels einer Wasserspritze unter Druck aus den Glasröhrchen herausgespült und zur Anpassung an die SDS-Konzentration der PAGE eine Stunde lang unter Schwenken in 5 ml IEF-Probenpuffer (6,25 mM Tris, 2,3 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % EtSH) equilibriert. Danach wurden die Rundgele entweder auf die PAGE aufgetragen oder bei -70°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung des pH-Gradienten in den Rundgelen wurde ein ohne Probe fokussiertes Gel in 1 cm-Stücke geschnitten, die 2-3 Stunden in 0,5 ml 0,02 M KCl in einem Exsiccator über 2 M NaOH (zur Entfernung des CO₂) eluiert wurden. Die pH-Messung erfolgte mit Hilfe einer pH-Mikroelektrode (Pusl).

II. 2.5.2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Für die Auftrennung in der 2. Dimension wurde eine Vertikal-Elektrophoresekammer (LKB 2001) benützt. 1,5 mm dicke Acrylamid-Gradientengele (T = 10-16,6 %) wurden zwischen Glasplatten, die nach Angaben der Herstellerfirma zu Gießkassetten zusammengesetzt worden waren, hergestellt (Gelgröße 16 x 14 cm). Zum Gießen von jeweils 2 Gelen wurden folgende Ansätze benötigt:

	Leichte Lösung	Schwere Lösung
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	6,75 ml	6,75 ml
50 % Acrylamid (C = 2,7 %)	5,40 ml	8,80 ml
10 % SDS	0,27 ml	0,27 ml
H ₂ O _{dest.}	14,53 ml	-
75 % (w/v) Glycerin	-	11,13 ml

Vor Zugabe von jeweils 39 µl 10 % APS und 13 µl TEMED als Polymerisationskatalysatoren wurden die Lösungen 10 min evakuiert, um eine homogene Polymerisation zu gewährleisten. Mit Hilfe eines Zweikammern-Gradientenmischers wurden aus je 13,5 ml der beiden Gellösungen lineare Acrylamidgradientengele gegossen (Fließgeschwindigkeit ca. 3 ml/min). Zur Erzielung einer ebenen Geloberfläche wurde mit 2 ml H₂O_{dest.} überschichtet, das nach beendeter Polymerisation (1-2 Stunden) durch Puffer (375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS) ersetzt wurde. So konnte das Gel auch über Nacht bei 4°C aufbewahrt werden.

Zur Aufbringung eines Sammelgels wurde der Puffer nach mindestens 1 Stunde Einwirkungszeit wieder abgesaugt und die Geloberfläche mit Filterpapier sorgfältig trockengetupft, bevor die obere Pufferkammer auf die Gießkassetten aufgesetzt und abgedichtet wurde. Für je 2 Sammelgele (T = 4 %) wurden gemischt:

- 7,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- 0,3 ml 10 % SDS
- 19,7 ml 75 % (w/v) Glycerin
- 2,5 ml 50 % Acrylamid (C = 2,7 %)

Nach Evakuieren wurden 90 µl 10 % APS sowie 30 µl TEMED zugesetzt, die Lösung bis zum oberen Rand in die Gießkassetten gefüllt und mit 2 ml H₂O überschichtet. Die Polymerisation dauerte bei Raumtemperatur wiederum 1-2 Stunden. Anschließend wurde das Wasser wieder abgesaugt und die Rundgele der 1. Dimension auf die Sammelgeloberfläche aufgelegt. Die Einbettung der Rundgele in ein 1 %iges Agarosegel (in IEF-Probenpuffer, mit Bromphenolblau angefärbt) gewährleistete einen guten Kontakt zwischen den beiden Gelen. Außerdem wurde am Rande des Gels

mit Hilfe eines Plexiglasstückchens eine 7 mm breite Auftragsmulde für Markerproteine im erstarrenden Agarosegel geformt, in die 20 µl einer Proteinstandardlösung aufgetragen wurden (je 1 mg Proteinmischung No. 4 und No. 5 (Serva) in 3,2 ml IEF-Probenpuffer und 0,8 ml Glycerin). Schließlich wurden die Gele in den mit 4 ml Laufpuffer gefüllten unteren Puffertank eingehängt und auch die obere Pufferkammer mit Laufpuffer aufgefüllt (Laufpuffer: 25 mM Tris, 0,19 M Glycin, 0,1 % SDS). Bei einer Stromstärke von 20 mA für je 2 Gele dauerte die Auftrennung ca. 16 Stunden, bei 50 mA ca. 8 Stunden. Sie wurde beendet, wenn die an der Front laufende Bromphenolblaubande eben am unteren Ende aus dem Acrylamidgel austrat. Die leichtesten Proteine liefen stets 2-3 cm hinter dieser Frontbande. Während der Auftrennung wurde die Geltemperatur durch Wasserkühlung auf ca. 15°C gehalten.

Nach beendeter Auftrennung wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten gelöst und nach Entfernen des Sammelgels mit Coomassie anfärbt (Färbelösung: 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R 250 in 95 % Ethanol : 10 % Essigsäure 1:1). Die Gele blieben für mindestens 4 Stunden unter ständigem Schwenken in der Färbelösung, bevor sie in drei Schritten entfärbt wurden:

- a) 95 % Ethanol : 5 % Essigsäure 2:3; 2 Stunden
- b) 95 % Ethanol : 5 % Essigsäure 4:1; 2 Stunden
- c) 5 % Essigsäure : H₂O 7:3; über Nacht

II. 2.5.3. Fluorographie

Anstelle der weniger sensitiven Autoradiographie wurden die Gele fluorographiert (BONNER und LASKEY, 1974). Zur Einlagerung von PPO als Szintillator in die Gele wurden diese durch 2 x 30 min Schwenken in DMSO entwässert, dann 4 Stunden in 22 % (w/v) PPO (Serva) in DMSO inkubiert. Durch anschließendes Einbringen der Gele in Wasser wurde das wasserunlösliche PPO im Gel ausgefällt. Mittels einer Vakuum-Trockenpresse wurden die Gele über Wasserdampf bei 80°C auf Filterpapier (Whatman Chromatographiepapier 0,38 mm) aufgetrocknet. Um die nur Coomassie-gefärbten Markerproteine auch auf Röntgenfilm sichtbar zu machen, wurden sie mit ³⁵S-Methionin enthaltender Tinte markiert.

Schließlich wurden die Gele auf Röntgenfilm aufgelegt, der 12 Tage bei -70°C exponiert wurde. (Entwickler: Kodak HC-110, 1:31 verdünnt, 5 min).

II. 2.6. Hemmung von Nuklease-Aktivität

Der Schlüssel zu brauchbaren mRNA-Präparationen ist die Minimierung von Nuklease-Aktivität während der Extraktion und sorgsames Vermeiden einer späteren Einschleppung von Nukleasen in die Proben. Als hauptsächliche "Gefahrenquellen" dürfen in dieser Hinsicht menschliche Hände und Bakterien gelten. Da eine Arbeit unter völlig sterilen Bedingungen labor-technisch nicht möglich war, wurde auf folgende Art für weitgehende Keimfreiheit gesorgt und so Nuklease-Aktivität unterbunden:

Alle Arbeiten wurden mit Einweghandschuhen durchgeführt, die verwendeten Lösungen sowie Zellstofftücher und Quarzküvetten 20 min autoklaviert und Glaswaren mindestens 2 Stunden auf 200°C erhitzt. Allen Lösungen sowie dem entionisierten Wasser wurde 0,05 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEP) zugesetzt, das als starker Nukleasehemmstoff gilt (FEDORCSAK und EHRENBURG, 1966). Eine Ausnahme machten Tris-Puffer, da sich DEP darin rasch unter Bildung von Ethanol und CO₂ zersetzt.

II. 3. Statistik

Ein bekanntes Problem vieler biologischer Datengewinnungsverfahren besteht darin, daß nicht 50 oder gar Hunderte von Meßwerten gewonnen werden können - zumindestens nicht mit einem vertretbaren Kosten- und Zeitaufwand -, so daß in der Regel nur ein kleiner Stichprobenumfang zur Verfügung steht. Eine rechnerische Bestimmung der zugrundeliegenden Verteilung ist in einem solchen Fall zweifellos mathematisch nicht exakt.

Alle Versuchsansätze wurden - soweit nicht anders angegeben - 3 bis 7 mal durchgeführt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aller Messungen dar. Standardabweichungen wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Da bei kleinen Stichprobenumfängen ($n \leq 20$) generell Zweifel bzgl. der Normalverteilungshypothese bestehen müssen, wurde zur statistischen Absicherung ein parameterfreier Test angewandt. Der Vorteil parameterfreier Methoden, nämlich die fehlende Voraussetzung einer bestimmten Verteilung der Stichprobenvariablen, wird allerdings erkauft durch den Nachteil einer etwas geringeren "Macht" oder Güte des Tests. Andererseits hat man den Vorteil, den Fehler exakt angeben zu können, im Gegensatz z.B. zum gebräuchlichen t -Test, wo der gewählte α -Wert für den Fehler sich unkontrolliert verändert, wenn die Grundgesamtheit nicht normalverteilt ist.

Eines der aussagekräftigsten verteilungsfreien Verfahren zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben (MOOD, 1954) ist der Rangsummentest nach MANN und WHITNEY (1947). In der vorliegenden Arbeit wurden damit die erhaltenen Meßergebnisse statistisch überprüft. Zur Berechnung der Prüfgrößen $U_{1,2}$ bringt man die Werte beider Stichproben in eine gemeinsame, aufsteigende Rangfolge. Die Summe der auf die Stichprobe x entfallenden Rangzahlen ist R_1 , für die Stichprobe y R_2 . Die Prüfgrößen U_1 und U_2 errechnen sich daraus wie folgt:

$$U_1 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

bzw. $U_2 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$

Der numerisch kleinere der berechneten U -Werte wird mit den für bestimmte Signifikanzniveaus tabellierten Werten verglichen. Daraus läßt sich ersehen, ob sich die Mittelwerte der beiden Stichproben signifikant voneinander unterscheiden. Für die Ergebnisse dieser Arbeit wurde dabei ein α -Signifikanzniveau von 95 % vorgegeben. Die verwendeten Tabellen sind entnommen aus WEBER (1980).

III. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BETEILIGUNG EINES BLÜHHEMMSTOFFS

Wie schon in der Einleitung erwähnt, gibt es zur Erklärung des Mechanismus der photoperiodisch regulierten Blütenbildung eine Reihe von Hypothesen, in denen verschiedene Autoren davon ausgehen, daß am Mechanismus der Blüteninduktion neben einem Blühhormon (Florigen) auch ein spezifischer Hemmstoff auf die eine oder andere Art beteiligt sein könnte. In jüngster Zeit ist die Diskussion darüber erneut aufgelebt, obwohl bis heute die Existenz eines solchen Hormons oder Hemmstoffs weder bewiesen noch widerlegt werden konnte.

Mit den folgenden Versuchen sollen einige neue Gesichtspunkte in diese Diskussion eingebracht werden.

III. 1. Auslösung der Blütenbildung durch Totalentblätterung

Das von MELCHERS und LANG (1941) gefundene Phänomen, bei *Hyoscyamus* durch Totalentblätterung die Entwicklung von Blütenanlagen auslösen zu können, fand in entsprechenden Versuchen von EICHHOFF (1969) keine Bestätigung. Um diese widersprüchliche Situation zu klären, wurden weitere Versuche durchgeführt.

III. 1.1. Versuchsdurchführung

Die Versuchspflanzen wurden im Alter von 5-6 Monaten vorsichtig bis auf einen "inneren Kegel" von 8-10 Blattprimordien entblättert. In diesem Alter hatten die Pflanzen schon eine so kräftige Rübe entwickelt, daß sie längere Zeit in blattlosem Zustand überdauern konnten. Durch zweimal wöchentliches Nachentblättern wurde dafür gesorgt, daß die Blattspreitenfläche der nachwachsenden Blättchen niemals größer als 1 cm² war. In verschiedenen Versuchsgruppen wurde der entblätterte Zustand 2, 4 oder 6 Wochen lang aufrecht erhalten oder die Pflanzen nach einmaligem Ent-

blättern gar nicht nachpräpariert. Zusätzlich wurden die Pflanzen während der Dauer des Versuchs unterschiedlichen Lichtbedingungen ausgesetzt, entweder einem 10 h-Kurztag, einem 16 h-Langtag oder Dauerlicht. Die Auswertung auf die Entwicklung von Blütenanlagen erfolgte in jedem Fall 6 Wochen nach Versuchsbeginn, wie in Abschnitt II.1.2. beschrieben.

III. 1.2. Ergebnisse

Obwohl auf die Betreuung der Versuchspflanzen vor allem während des blattlosen Zustands alle erdenkliche Sorgfalt gelegt wurde, waren die Ausfälle durch Faulen der Rübe oder Einziehen des Vegetationskegels relativ hoch. Wurden die Rüben jedoch sehr trocken gehalten und überstieg die Temperatur nicht 20-22°C, überstanden viele Pflänzchen selbst eine sechs Wochen andauernde Entblätterung allein mit Hilfe der Reservestoffe in ihrer Rübe.

Die Ergebnisse von 7 unabhängig durchgeführten Versuchen mit insg. 175 überlebenden und somit auswertbaren Pflanzen sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Bei einmaligem Entfernen der Blätter erfolgte keine Blühreaktion. Erst bei 14 Tage langem Entblättern waren erstmals bei einigen Pflanzen Blütenanlagen mit bloßem Auge zu erkennen, nach vier Wochen Dauerentblätterung zeigten bereits ca. 50 % aller Pflanzen eine positive Reaktion, ebenso in einer sechs Wochen lang entblätterten Versuchsgruppe.

Daß bei vierwöchiger Entblätterung unter KT-Bedingungen nur 40 % der Pflanzen Blütenknospen entwickelten, dagegen im LT 65 %, sollte nicht zu der Annahme verleiten, die Mechanismen der photoperiodischen Induktion seien auch unter diesen Bedingungen noch wirksam. Zum einen ist bei den blühenden Exemplaren kein verminderter Blattzuwachs festzustellen, zum anderen blühen in den sechs Wochen lang entblätterten Versuchsgruppen unter induktiven Lichtbedingungen deutlich weniger Pflanzen als im KT. Dabei waren die verwendeten Lichtflüsse für

Tab.1: Induktion der Blütenbildung durch Totalentblätterung
(KT: Kurztag, LT: Langtag, DL: Dauerlicht)

Dauer der Entblätterung	Tageslänge	Versuchs- pflanzen	blühend			vegetativ		
			Anzahl	%	Blatt- zuwachs	Anzahl	%	Blatt- zuwachs
einmalig	KT	14	0	0	-	14	100	18
2 Wochen	KT	23	3	13	20	20	87	22
	LT	12	2	17	23	10	83	20
4 Wochen	KT	32	13	41	24	19	59	29
	LT	23	15	65	26	8	35	26
6 Wochen	KT	53	30	57	24	23	43	24
	DL	18	4	22	25	14	78	17

eine vollständige Induktion der Blütenbildung durchaus ausreichend, was durch mitgeführte, nicht entblätterte Kontrollpflanzen, die ohne Ausnahme blühten, überzeugend bewiesen wurde.

Eine gewisse Umkehrung der photoperiodischen Reaktion bei entblätterten Hyoscyamus-Pflanzen beobachteten jedoch auch schon LANG und MELCHERS (1942), ohne sie physiologisch erklären zu können.

III. 2. Auslösung der Blütenbildung durch 2-Thiouracil (2-TU)

Der Antimetabolit 2-Thiouracil zeigt bei verschiedenen Pflanzenarten eine Vielzahl verschiedener Auswirkungen auf Physiologie und Morphologie. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kann er auch die photoperiodische Blühinduktion beeinflussen. Als Basenanalogon schien 2-TU geeignet, mögliche Zusammenhänge zwischen dem Nukleinsäurestoffwechsel und der Induktion der Blütenbildung zu untersuchen.

III. 2.1. Infiltration der Pflanzen

Die jeweiligen Testsubstanzen wurden mittels einer Vakuum-Infiltrationsmethode (EICHHOFF und RAU, 1969) in die Blätter eingebracht. Dazu wurden am Vortag alle Blätter einer Versuchspflanze mit Ausnahme der 4 jüngsten, aber schon vollentwickelten, abpräpariert. Zum Schutz des Vegetationspunkts blieben etwa 10 Blattprimordien stehen.

2-Thiouracil, 5-Fluoruracil (beide Fluka) oder Uracil (Merck) wurden in einer Konzentration von 10^{-3} M in entionisiertem Wasser gelöst, das zwecks besserer Löslichkeit zunächst mit KOH alkalisch gemacht wurde. Mit HCl wurde anschließend ein für die Pflanzen verträglicherer pH-Wert von 7,5-8,0 eingestellt und die Lösung auf ca. 20°C erwärmt.

Die Pflanzen wurden nun mit Hilfe einer Lochplatte so "kopfüber" in einen Exsikkator eingehängt, daß nur die Blattspreiten in die zu applizierende Lösung eintauchten. Bei ausreichender Beleuchtung (an trüben Tagen ggf. Zusatzlicht mit starken Glühlampen) genügte ein 20 min langes Evakuieren, um die Blattinterzellularen maximal mit der Lösung zu füllen, was den Blättern ein gläsern-durchscheinendes Aussehen verlieh.

Nach kurzem Abspülen mit Wasser wurden die Pflanzen in einem warmen Luftstrom getrocknet, um das Lösungsmittel wieder aus den Intercellularen zu entfernen und so Nekrosenbildung zu vermeiden. Anschließend blieben die Pflanzen bis zur Kontrolle auf Blütenbildung noch sechs Wochen unter Kurztagbedingungen im Gewächshaus stehen.

III. 2.2. Ergebnisse

III. 2.2.1. Induktion der Blütenbildung durch 2-TU und Revertierbarkeit durch Uracil

Erste orientierende Versuche von EICHHOFF (1969) wiesen darauf hin, daß sich die blüteninduzierende Wirkung von 2-TU innerhalb einer Zeitspanne von einigen Stunden durch eine anschließende Gabe der natürlichen Base Uracil wieder aufheben läßt. Weitere Versuche zu dieser Revertierbarkeit des 2-TU-Effekts sollten zum einen die statistische Aussagekraft erhöhen, da EICHHOFF nur sehr wenige Pflanzen für seine Untersuchungen zur Verfügung standen, zum anderen durch weitere Variationen der Versuchsbedingungen eine Präzisierung der Aussagen ermöglichen.

Zunächst wurden die Versuchspflanzen mit einer 10^{-3} M 2-TU-Lösung infiltriert und nach verschiedenen Zeitspannen mit einer gleichmolaren Uracillösung nachinfiltriert (Tab.2).

Von den ausschließlich mit einer einmaligen 2-TU-Infiltration behandelten Pflanzen zeigten über 50 % eine Ausbildung von Blütenanlagen. Während mit einer unmittelbaren Nachinfiltration die 2-TU-Wirkung noch vollständig aufgehoben werden konnte, ließ die Revertierbarkeit der Induktion an den darauffolgenden Tagen sukzessive nach, bis am 4. Tag nach 2-TU-Gabe keine Reversion mehr zu erkennen war.

Nachinfiltrationen mit Wasser, die bezüglich einer Reversion völlig unwirksam blieben, zeigen, daß die Revertierung der Blühinduktion keineswegs auf einen Auswaschungs- oder Verdünnungseffekt des 2-TU oder auf den zusätzlichen Streß einer Zweitinfiltration zurückzuführen ist.

Tab.2: Reversion der blüteninduzierenden Wirkung von 2-Thiouracil (2-TU) durch Nachinfiltration von Uracil (U) nach verschiedenen Zeitintervallen. 2-TU und U jeweils 10-3 M, Kontrollen durch Nachinfiltrationen mit Wasser.

Behandlung (Zeit zwischen Erst- und Nachinfiltration)	Anzahl Pflanzen		Blühinduktion (in %)	Reversion (in %)
	gesamt	induziert		
2-TU (Kontrolle)	183	96	53	-
2-TU + U (0 h)	96	0	0	100
2-TU + U (24 h)	74	12	16	70
2-TU + U (48 h)	73	23	32	40
2-TU + U (72 h)	70	29	41	23
2-TU + U (96 h)	47	25	53	0
2-TU + H ₂ O (0 h)	42	23	55	0
2-TU + H ₂ O (48 h)	38	20	53	0
2-TU + H ₂ O (96 h)	21	11	52	2

Offenbar laufen bis zum 3. Tag Primärprozesse ab, die durch Ersatz des 2-TU durch Uracil noch umkehrbar sind. Danach stattfindende Folgeprozesse sind durch eine weitere Infiltration nun nicht mehr zu beeinflussen. Versuche, bei denen die Nachinfiltration mit erhöhten Uracilkonzentrationen vorgenommen wurde, legen die Vermutung nahe, daß der Uracileffekt auf einer Verdrängung des 2-TU von seinem Wirkort beruht.

Abb.1 macht in einer zusammenfassenden Darstellung die erhöhte Reversionswirksamkeit der Nachinfiltration deutlich, wenn Uracil in drei- bzw. zehnfachem Überschuß gegeben wird. Selbst mit zehnfachem Uracilüberschuß scheint aber nach 3 Tagen eine gewisse Grenze für die Revertierbarkeit erreicht zu sein.

Kontrollversuche mit 5-Fluoruracil, 2-Thiocytosin und 6-Thioguanin (jeweils 20 Pflanzen, Infiltrationslösungen 10^{-3} M), in denen keine einzige Pflanze Blütenanlagen entwickelte, bestätigen die Induktion der Blütenbildung als einen spezifischen Effekt von 2-TU, der nicht durch beliebige Basenanaloga ebenfalls erreichbar ist.

III. 2.2.2. Einbau von 2-TU in die RNA

Daß 2-TU, ebenso wie eine Reihe anderer Basenanaloga, in RNA eingebaut wird, wurde schon mehrfach gezeigt (u.a. HESS, 1959; TUPY, 1966). Es stellte sich die Frage, in welchem Maße ein solcher Einbau unter unseren Versuchsbedingungen (Applikation durch Infiltrationstechnik, beobachteter Zeitraum) stattfindet und welcher Anteil davon speziell in m-RNA integriert wird, also in diejenige Nukleinsäureklasse, die bei Untersuchungen von Regulationsvorgängen wohl am meisten interessiert. Zur Klärung dieser Fragen wurde $2\text{-}^{14}\text{C-TU}$ ($2,3 \text{ MBq}/\mu\text{mol}$) in Blattgewebe infiltriert. Zum Vergleich diente Pflanzenmaterial, das mit $2\text{-}^{14}\text{C-Uracil}$ ($2,2 \text{ MBq}/\mu\text{mol}$) behandelt wurde (beide Testsubstanzen Amersham). Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit wurde die unter II.2.1. beschriebene Infiltrationsmethode modifiziert: Vollentwickelte Blätter wurden in 0,1 % Hypo-

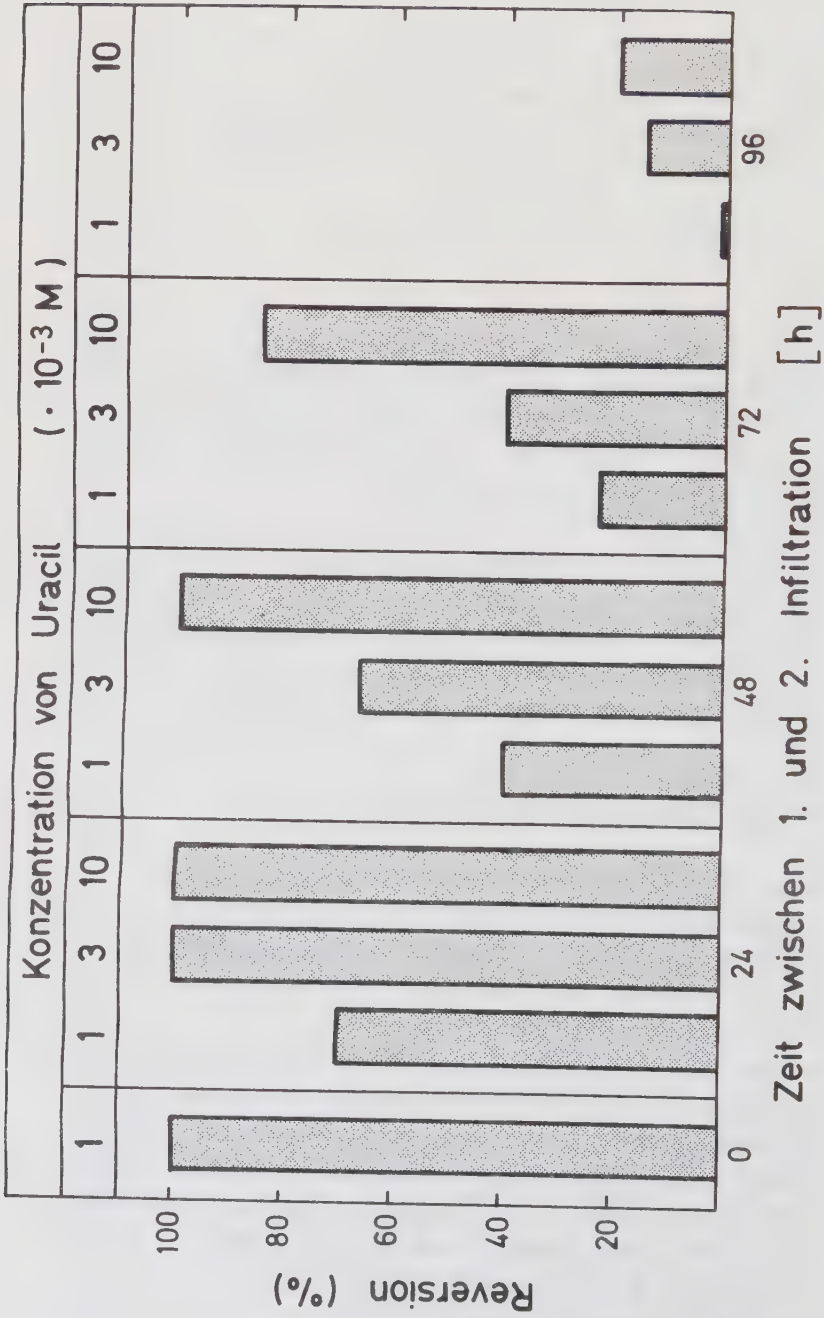


Abb.1:

Reversion einer Induktion der Blütenbildung durch 10^{-3} M 2-TU mittels Nachinfiltration von Uracil in verschiedener Konzentration und nach unterschiedlichen Zeitintervallen. (Ergebnisse von EICHHOFF (1969) wurden mit berücksichtigt.)

chloridlösung 20 min oberflächensterilisiert (CHRISPEELS und VARNER, 1967). Aus den Blattspreiten wurden Scheibchen von 1 cm Durchmesser ausgestanzt, einem Frischgewicht von 2,5 g entsprechend (ca. 130 Scheibchen). Die Infiltrationslösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

2,0 ml Nukleotidlösung
1,8 ml 5 mM Uracil bzw. 2-TU, pH 7,4
1,0 ml 0,8 mM 2-¹⁴C-Uracil bzw. 2-¹⁴C-TU
(entspricht je 1,9 MBq)
5,2 ml H₂O_{bidest.}

Die Nukleotidlösung enthielt je 5 mM Adenosin-5-P, Cytidin-5-P und Guanosin-5-P. Der Zusatz von nicht-markierten RNA-Bausteinen sollte gewährleisten, daß während der Einbauzeit der radioaktiv markierten Basen eine optimale RNA-Neusynthese stattfinden kann. Fünfminütiges Evakuieren eines mit der Infiltrationslösung und den Gewebescheibchen beschickten Saugfingers mit der Wasserstrahlpumpe genügte, um eine vollständige Füllung der Intercellularen zu erreichen.

Durch Bestimmung der nicht-aufgesogenen Lösung konnte das von den Blättchen aufgenommene Lösungsvolumen berechnet werden. Die infiltrierten Blattscheibchen wurden in einem warmen Luftstrom getrocknet, um das Lösungsmittel aus den Intercellularen zu entfernen. Während der Einbauzeit, in der sie mit Weißlicht bestrahlt wurden, schwammen die Blättchen auf Knop'scher Nährlösung, der Bacitracin (2 units/ml) und Penicillin-G (2 µg/ml) zugesetzt waren, um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden. Nach 8 Stunden wurden die Scheibchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C aufbewahrt. Die Extraktion der RNA sowie die Isolierung der Poly(A)-RNA erfolgte wie unter II.2.2. und II.2.3. beschrieben.

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden jeweils Aliquots der entsprechenden Lösungen in 10 ml Toluol-Triton X 100-Cocktail (Verhältnis 2:1 mit 0,7 % Butyl-PBD) im Scintillationszähler auf 2 % Fehler gezählt. In Tab.3 sind die dabei erhaltenen Werte zusammengestellt.

Tab.3: Markierung der RNA mit ^{14}C -Uracil und $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Thiouracil
(Einbauzeit: 8 h; Mittelwerte aus 2 Versuchen)

	^{14}C -Uracil	$2\text{-}^{14}\text{C}$ -TU	Hemmung durch $2\text{-}^{14}\text{C}$ -TU (%)
Quantitative RNA-Bestimmung:			
Gesamt-RNA ($\mu\text{g/g}$ FG)	450	350	22
Poly(A)-RNA ($\mu\text{g/g}$ FG)	5,1	3,9	24
Radioaktive Markierung der RNA:			
Poly(A) ⁺ (Bq/ μg)	2,22	0,48	78
Poly(A) ⁻ (Bq/ μg)	1,88	0,45	76

Unter dem Einfluß von $2\text{-}^{14}\text{C}$ -TU wurden sowohl bei der Gesamt-RNA als auch in der Poly(A)-haltigen Fraktion um etwa 20 % verringerte Werte gemessen. Bei der Bestimmung des Einbaus der radioaktiv markierten Substanzen jedoch zeigte sich eine weitaus drastischere Wirkung des Antimetaboliten: mit Thiouracil betrug die radioaktive Markierung der RNA nur etwa ein Fünftel des Uracilwerts, in der Poly(A)-Fraktion ebenso wie in der restlichen RNA.

Die gesamten Zahlen könnten eine Reduktion u.a. der mRNA-Neusynthese um fast 80 % bedeuten, wenn der Zelle statt des natürlichen Uracils nur 2-TU zur Verfügung steht. Dies gilt zumindest für die ersten 8 Stunden nach Zugabe der Substanz und unter der Voraussetzung gleicher Einbauraten für Uracil und seinen Antimetaboliten. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß durch eine gegenüber Uracil verringerte Einbaufähigkeit für 2-TU noch ein erheblicher Anteil nicht-markierte RNA synthetisiert wurde. Trotz eines $2\text{-}^{14}\text{C}$ -TU-Überangebots könnte bis zur Erschöpfung des endogenen "pools" der Zelle Uracil selektiv für Neusynthesen herangezogen werden.

III. 2.2.3. Einfluß von 2-TU auf den RNA-Stoffwechsel im Blatt

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, kann mit ziemlicher Sicherheit angenommen werden, daß die Regulation der Blütenbildung am Vegetationspunkt via differenzielle Genaktivierung verläuft. Weniger Klarheit besteht darüber, ob auch auf der Ebene des Blattes das Nukleinsäuresystem und eine Bildung neuer spezifischer Proteine beteiligt ist. Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen beschränken sich daher ausschließlich auf mit der Blühinduktion in Zusammenhang stehende Vorgänge im Blatt.

III. 2.2.3.1. Gesamt-RNA

Die Versuchspflanzen wurden, wie unter II.2.1. beschrieben, mit 10^{-3} M 2-TU infiltriert, ein Teil davon anschließend mit Uracil gleicher Molarität nachinfiltriert. Eine Vergleichsgruppe wurde in gleicher Weise mit dem bezüglich Blühinduktion unwirksamen (siehe III.2.2.1.) 5-FU, ebenfalls 10^{-3} M, behandelt. Bei jedem Versuchsansatz wurden unbehandelte KT-Kontrollpflanzen sowie eine Vergleichsgruppe nach Blühinduktion durch 3 Tage Dauerlicht mitgeführt. 72 Stunden nach der Infiltration wurde aus den Blättern mit der unter II.2.2. beschriebenen Methode die cytoplasmatische RNA extrahiert und photometrisch bestimmt.

Der Reinheitsgrad aller Präparationen, gemessen am Verhältnis $A_{260} : A_{280}$, war mit 1,8-2,0 gleichbleibend gut. Dies und die zufriedenstellend hohen Ausbeuten zeigen die Vorzüge der schnellen und sauberen Proteinase K-Methode – vor allem gegenüber der häufig angewandten Phenol-Extraktion, deren Nachteil es nicht zuletzt ist, daß Nukleasen in Phenol nicht ausreichend schnell zerstört werden (LAULHERE, 1976).

Der gemessene RNA-Gehalt ist in Abb.2 graphisch dargestellt, und zwar relativiert auf die in den unbehandelten Kontrollen gefundenen Werte. (Die Absolutwerte sind Tab. 4 zu entnehmen.)

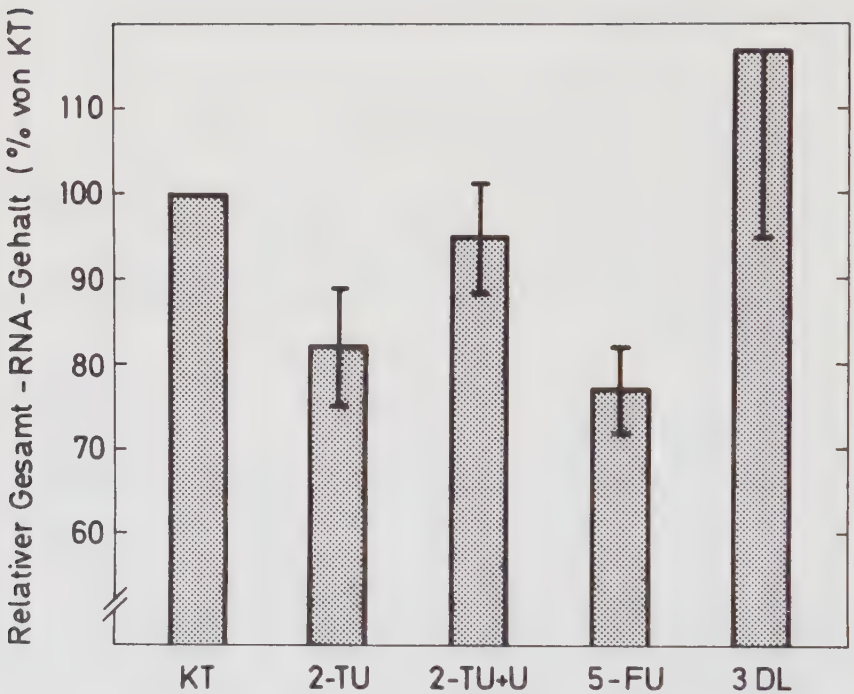


Abb.2:

Gesamt-RNA-Gehalt in den Blättern, relativiert auf die Kurztag-Kontrollen (KT). Standardabweichungen sind eingezeichnet. Extraktion 72 h nach Infiltration verschiedener Pyrimide (jeweils 10^{-3} M). KT: Kurztag; 3 DL: 3 Dauerlichttage; 2-TU + U: Nachinfiltration mit Uracil direkt nach 2-TU-Applikation.

Eine 2-TU-Infiltration bewirkte eine Verringerung des RNA-Gehalts um ca. 20 %. Auch hier hatte eine Uracil-Nachinfiltration revertierende Wirkung. Jedoch zeigt die mit 5-FU behandelte Versuchsgruppe, daß diese RNA-Reduktion kein 2-TU-spezifischer Effekt ist, sondern wohl mit der allgemeinen Hemmwirkung der Antimetabolite erklärt werden muß.

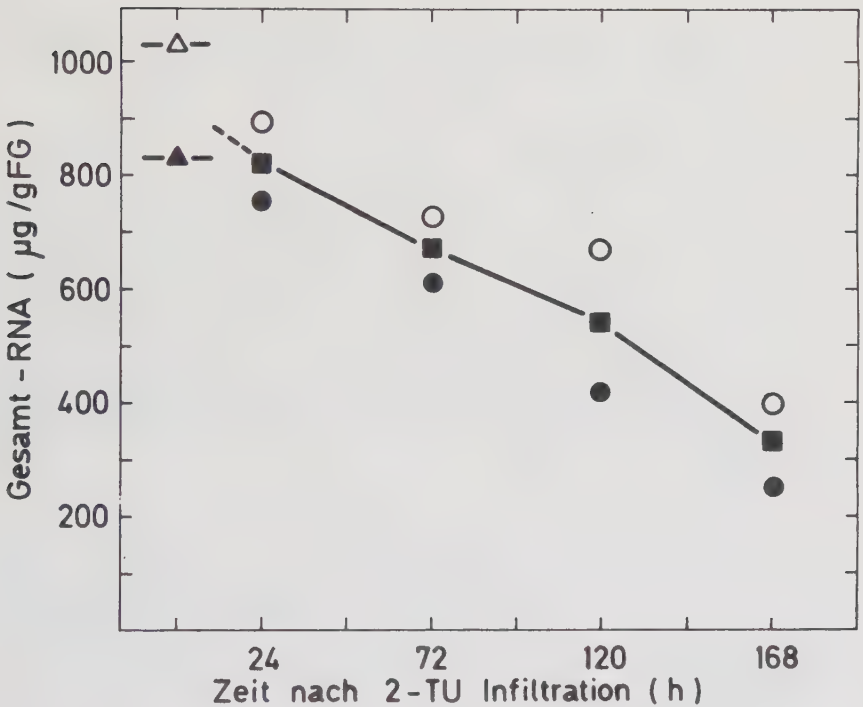


Abb.3:

Kinetik der 2-TU-Wirkung auf den Gesamt-RNA-Gehalt. Mittelwerte aus zwei Versuchen unter Angabe der Einzelmeßwerte (o bzw. ●). Δ bzw. ▲ entspricht der jeweiligen KT-Kontrolle.

Nicht chemo-, sondern lichtinduzierte Pflanzen wiesen dagegen einen um etwa 20 % erhöhten RNA-Gehalt auf. (Der statistische Test bestätigte trotz der relativ großen Streuung der Meßwerte einen signifikanten Unterschied zwischen der DL- und der KT-Versuchsgruppe.) Bei dieser Gegenüberstellung wurde nur die Situation zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der jeweiligen Behandlung der Pflanzen untersucht. Um ein Bild über den Wirkungsverlauf einer 2-TU-Infiltration zu bekommen, wurden in zwei weiteren Versuchen ein bis sieben Tage nach der Infiltration Blattproben zur RNA-Extraktion genommen. In diesem Zeitraum nahm der RNA-Gehalt kontinuierlich ab, bis er nach einer Woche schließlich weniger als die Hälfte des Ausgangswerts hatte (Abb.3).

Die hemmende Wirkung des Antimetaboliten scheint also über diese Zeitspanne hinweg unvermindert fortzubestehen.

III. 2.2.3.2. Poly(A)-RNA

Aus den RNA-Präparationen wurde die Poly(A)-haltige RNA mittels Adsorptionschromatographie an Oligo-dT-Cellulose, wie unter II.2.3. beschrieben, isoliert. Die Reinheit der so gewonnenen RNA-Fraktion konnte von zunächst unbefriedigenden 1,6-1,7 auf Werte von 1,9-2,0 des Absorptionsquotienten $A_{260} : A_{280}$ gesteigert werden, und zwar durch eine Vorreinigung der Gesamt-RNA-Präparation über eine nicht-thymidilierte Cellulosesäule.

Tab.4: RNA-Gehalt, 72 h nach Infiltration der verschiedenen Basen.

	Kurztage	2-TU	revertiert	5-FU	3 DL
Gesamt-RNA ($\mu\text{g/g}$ FG)	795	652	739	613	928
Poly(A)-RNA ($\mu\text{g/g}$ FG)	5,13	5,33	4,93	5,41	4,88
% von KT-Wert	100	104	96	105	95
% Poly(A)-RNA von Gesamt	0,64	0,82	0,67	0,88	0,53

Die erhaltenen Zahlenwerte sind in Tab.4 zusammengestellt. Dabei wird deutlich - und eine Überprüfung der Meßwerte mit statistischen Methoden bestätigte dies -, daß sich in dieser RNA-Fraktion unter den verschiedenen Bedingungen keine quantitativen Unterschiede ergaben. Da zugleich aber nach 2-TU- und 5-FU-Gabe der Gesamt-RNA-Gehalt abnahm, liegt die Vermutung nahe, daß hierbei eine Neusynthese von Poly(A)-RNA selektiv gefördert wurde, zumal die unter II.2.2.2. beschriebenen Versuche zeigen, daß noch 8 Stunden nach 2-TU-Gabe die Poly(A)-haltige Fraktion in gleichem Maß vermindert ist wie die übrige RNA.

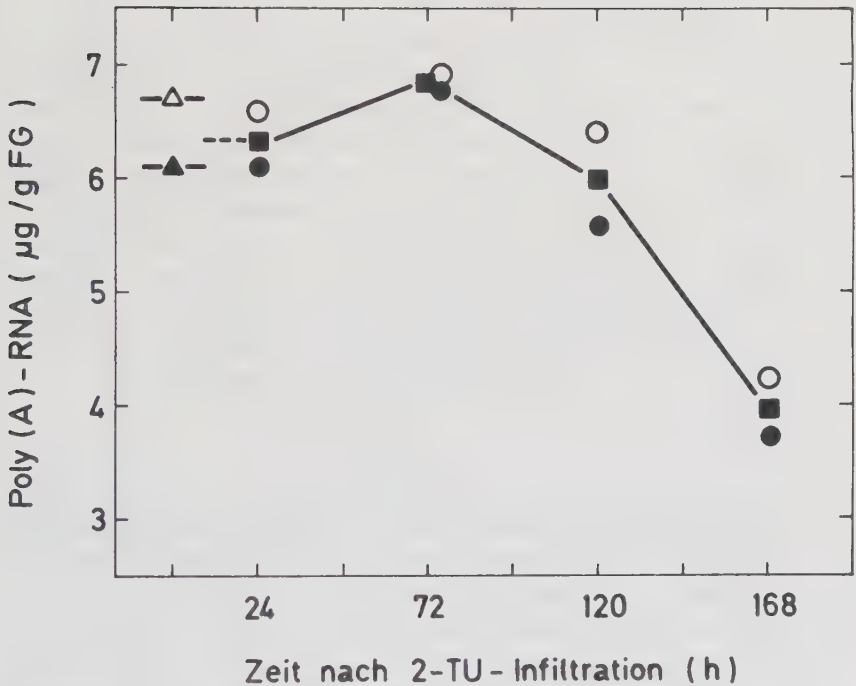


Abb.4:

Kinetik der 2-TU-Wirkung auf den Poly(A)-RNA-Gehalt. Mittelwerte aus 2 Versuchen unter Angabe der Einzelmesswerte (o bzw. ●) und der jeweiligen KT-Kontrollen (Δ bzw. ▲).

In der Kinetik (Abb.4) zeigte sich, daß 2-TU in der Poly(A)-haltigen RNA-Fraktion im Gegensatz zur Gesamt-RNA im Zeitraum von 24-72 h keine Reduktion bewirkte. Ab etwa fünf Tagen nach seiner Applikation allerdings nahmen auch hier die RNA-Gehalte deutlich ab. Aus dieser quantitativen Bestimmung allein läßt sich jedoch nicht entscheiden, ob sich hier nicht etwa zwei gegenläufige Vorgänge nach außen hin gegenseitig aufheben. Eine allgemeine RNA-Abnahme, bedingt durch die Antimetaboliten-Wirkung, könnte kompensiert sein durch einen vorübergehenden mRNA-Anstieg als Folge einer verstärkten "repair-Bemühung" der Pflanze.

III. 2.2.3.3. Translationsaktivität

Um mögliche qualitative Veränderungen der Poly(A)-RNA durch 2-TU feststellen zu können, wurden deren Matrizeneigenschaften in einem zellfreien Translationssystem getestet (Durchführung siehe II.2.4.). Einem Kaninchen-Reticulocyten-System wurde dabei gegenüber den oft verwendeten Weizenkeimsystemen der Vorzug gegeben, weil es einen vergleichsweise größeren Molekulargewichtsbereich der translatierten Polypeptide aufweist. Nach anfänglich enttäuschenden Ausbeuten mit verschiedenen käuflichen Lysaten, fand sich in der Firma New England Nuclear eine Quelle für ein offenbar genau an Hyoscyamus-RNA angepaßtes Translationssystem. Die damit mit unserer RNA erzielten Werte lagen durchweg über denen der Kontroll-Ansätze mit der dem System beigegebenen, "aktivitätsgetesteten" Hefe-mRNA.

Die Reaktion wurde mit 1 µg Poly(A)-RNA pro 25 µl Testgemisch durchgeführt. Höhere Konzentrationen brachten keinen weiteren linearen Anstieg der Proteinsynthese mehr und führten schließlich sogar zu einer Hemmung der Reaktion, ein Befund, der auch aus der Literatur bekannt ist (u.a. TOBIN und KLEIN, 1975).

Außerdem sollte die Poly(A)-RNA der limitierende Faktor im Translationsgemisch sein, um eine Konkurrenzsituation unter den einzelnen mRNAs zu vermeiden. Die Effizienz der Translation spezifischer mRNAs scheint von der Konkurrenz um Initiationsfaktoren abhängig zu sein, was zu Unterschieden in den **relativen** Proportionen der verschiedenen Polypeptide bei steigender Menge translaterter Poly(A)-RNA führen kann (KLOPPSTECH, 1985).

Abb.5 gibt den zeitlichen Verlauf einer typischen Reaktion unter den beschriebenen Bedingungen wider. Die in vitro-Synthese von Polypeptiden war 30 Minuten nach Zugabe der exogenen Poly(A)-RNA praktisch beendet. Die in den Versuchen eingehaltene Inkubationszeit von einer Stunde war demnach ausreichend.

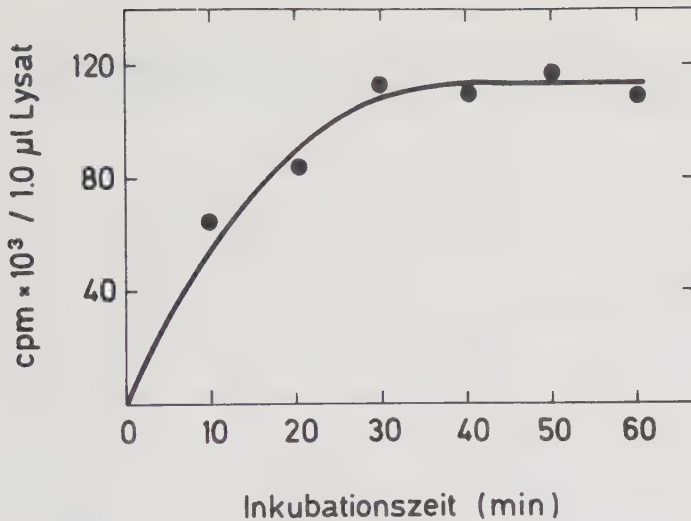


Abb.5:

Reaktionsverlauf eines typischen Translationsansatzes, gemessen am ³⁵S-Einbau in TCA-fällbares Material, bei einem Einsatz von 1 µg Poly(A)-RNA pro 25 µl Reaktionsgemisch.

Die Matrizenaktivität der Poly(A)-RNA unter den verschiedenen Versuchsbedingungen ist in Tab.5 zusammengestellt, ausgedrückt als Einbau von ³⁵S-Methionin in TCA-fällbares Material; zur Verdeutlichung sind die relativierten Werte nochmals in Abb.6 dargestellt.

Obwohl die hohe Translationsaktivität von Dauerlicht-induzierten Pflanzen durch Chemoinduktion nicht erreicht wurde, zeigten 2-TU-infiltrierte Pflanzen doch eine deutliche Aktivitätssteigerung gegenüber den unbehandelten Kontrollen, die durch Uracil-Nachinfiltration vollständig revertierbar war.

Daß dies nicht nur als "Anstrengung" der Pflanze, die durch einen Antimetaboliten verursachten "Schäden zu reparieren", verstanden werden darf, zeigen die mit 5-FU behandelten Pflanzen, in denen dieser Antimetabolit eine deutlich hemmende Wirkung ausübte.

Tab.5: Matrizenaktivität der Poly(A)-RNA im in vitro-Translationssystem, gemessen am Einbau von ^{35}S -Methionin in TCA-fällbares Material. (1 μg Poly(A)-RNA auf 25 μl Reaktionsgemisch, Inkubationszeit 60 min)

	KT	2-TU	revertiert	5-FU	3 DL
^{35}S -Einbau (KBq/ μg Poly(A)-RNA)	32,6	39,0	32,0	28,4	55,4
% von KT-Wert	100	119	98	87	169

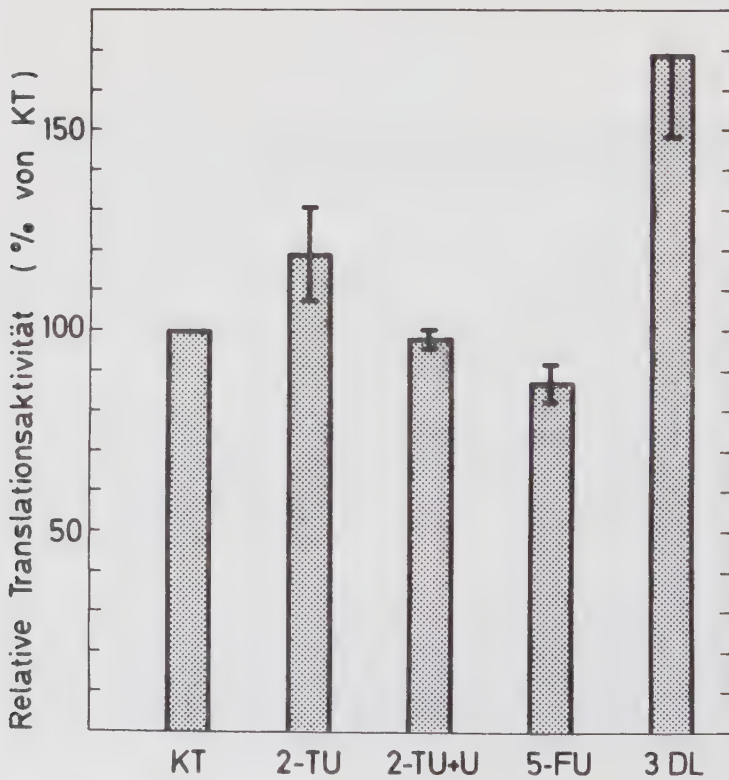


Abb.6:

Translationsaktivität der Poly(A)-RNA im in vitro-System
(vgl.Tab.5)

Bei der Erstellung einer Kinetik der 2-TU-Wirkung auf die Matrizenaktivität der Poly(A)-RNA ergab sich ein interessanter Kurvenverlauf (Abb.7):

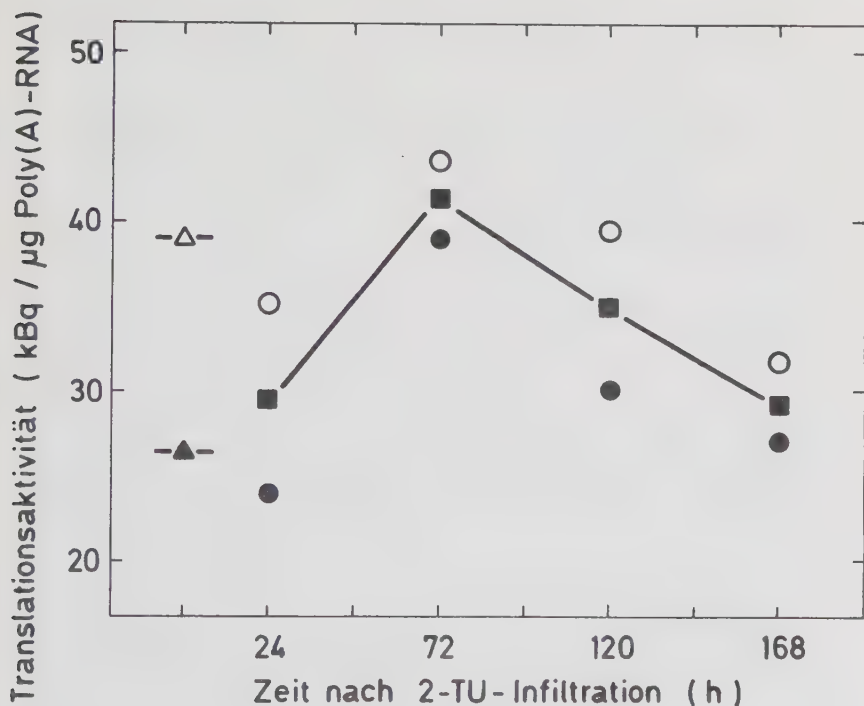


Abb.7:

Kinetik der Translationsaktivität von Poly(A)-RNA nach 2-TU-Infiltration. Einbau von ^{35}S -Methionin in TCA-fällbares Material im in vitro-Translationssystem. Mittelwerte aus 2 Versuchen unter Angabe der Einzelmeßwerte (o bzw. ●) und der jeweiligen KT-Kontrollen (Δ bzw. ▲).

Die Translationsaktivität scheint am dritten Tag nach der Infiltration einen Gipfel zu erreichen, um dann wieder abzusinken. Dies könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, daß bei der Blütenbildung von *Hyoscyamus niger* offenbar einem Zeitraum von 72 Stunden eine besondere Bedeutung zukommt.

III. 2.2.4. Veränderungen in der Zusammensetzung der in vitro-Translationsprodukte

Bei einer nur quantitativen Bestimmung der in vitro-Translationsprodukte sind aufgrund der Vielzahl neu synthetisierter Polypeptide Veränderungen einzelner oder einiger weniger nicht erkennbar. Gerade die spezifische Wirkung von 2-TU auf die Blütenbildung legt es aber nahe, daß dabei eine selektive Beeinflussung bestimmter Nukleinsäure-Protein-Systeme vorliegt. Um solche möglichen spezifischen Veränderungen zu erfassen, wurde mittels elektrophoretischer Auftrennungen die Zusammensetzung der Translationssprodukte untersucht.

Als geeignete Methode zur Auftrennung eines solch komplexen Proteingemisches erwies sich eine zweidimensionale Elektrophorese, wie sie von O'FARRELL (1975) beschrieben worden war, der damit über 1 100 verschiedene Proteine aus *Escherichia coli* auseinandergetrennt hatte. Aus den Translationsprodukten der Poly(A)-RNA aus *Hyoscyamus* konnten zwar "nur" 300-350 verschiedene Proteinspots sichtbar gemacht werden, was aber immer noch das Auflösungsvermögen jeder eindimensionalen Auftrennung weit übersteigt.

Die eingesetzten Proteinmengen, die jeweils einer ^{35}S -Radioaktivität von 8,3 kBq entsprachen, waren so gering, daß mit Coomassie-Anfärbung nur sehr schwache und undeutliche Spotmuster zu erkennen waren. Bei Fluorographie ergab sich jedoch nach 10-12 Tagen Expositionszeit eine ausreichende Schwärzung des Röntgenfilms. Eine längere "Belichtungszeit" führte nur noch zu einer zunehmend stärkeren Hintergrundschwärzung des Filmmaterials.

Während die endogene Aktivität des verwendeten Reticulocytenlysats sich im Elektrophoresegel nur als ein einziger Spot manifestierte (WARM, 1984), zeigte sich nach Zugabe von Poly(A)-RNA aus *Hyoscyamus* ein differenziertes Polypeptidmuster, das sich stets über den gesamten Auf-

trennungsbereich erstreckte (pH 4-7, Molekulargewichte von ca. 5-80 kDalton). In Abb. 8 sind als Beispiel für einen typischen Versuch Fluorographien von Translationsprodukten nach verschiedener Infiltrationsbehandlung einander gegenübergestellt.

Wenngleich unter den unterschiedlichen Bedingungen der weitaus größte Teil der Polypeptide nach den untersuchten Parametern identisch ist, fallen bei den Proben aus 2-TU-infiltrierten Pflanzen (Abb.8b) einige gegenüber den KT-Kontrollen (Abb.8a) veränderte Spots auf (in den Abbildungen mit Pfeilen bezeichnet). Translationsprodukte von Uracil-revertierten (Abb.8c) sowie von 5-FU-infiltrierten Pflanzen (Abb.8d) zeigen diese Veränderungen nicht, sondern entsprechen der KT-Kontrolle. Der naheliegenden Vermutung eines **direkten** Zusammenhangs zwischen der Induktion der Blütenbildung durch 2-TU und den angesprochenen Veränderungen im Muster der Translationsprodukte steht das Ergebnis einer weiteren Kontrolle entgegen (Abb.18c) :

Die Translationsprodukte von m-RNA aus Pflanzen, die mit Dauerlicht blühinduziert wurden, stimmen bezüglich der bezeichneten Polypeptide nicht mit denen der 2-TU-behandelten Pflanzen, sondern mit denen der KT-Kontrolle überein.

Eine Zusammenstellung der 2-TU-bedingten Veränderungen im Muster der Translationsprodukte gibt Tab.6.

Abb.8: Durch zweidimensionale Elektrophorese aufgetrennte Translationsprodukte (Fluorographien) von mRNA aus Blättern verschieden behandelter Versuchspflanzen. Die durch Pfeile bezeichneten Polypeptide werden in Tab.6 näher beschrieben.

pH 4

← IEF

pH 7 KD

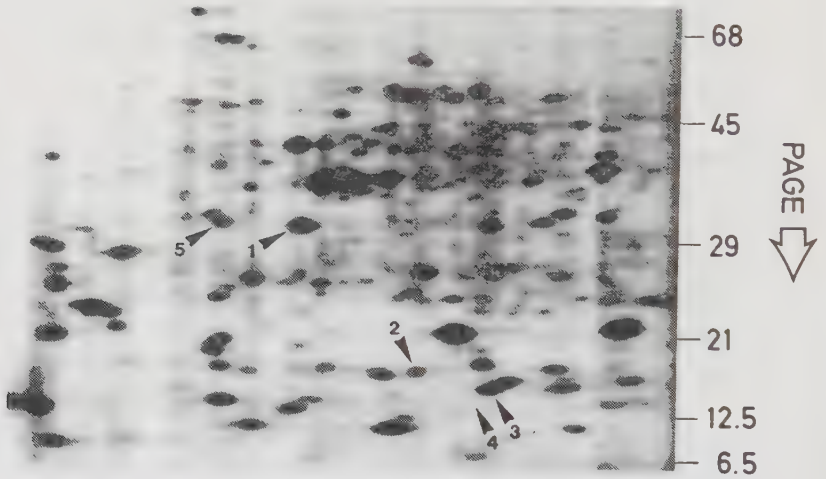


Abb.8a:
KT-Kontrolle

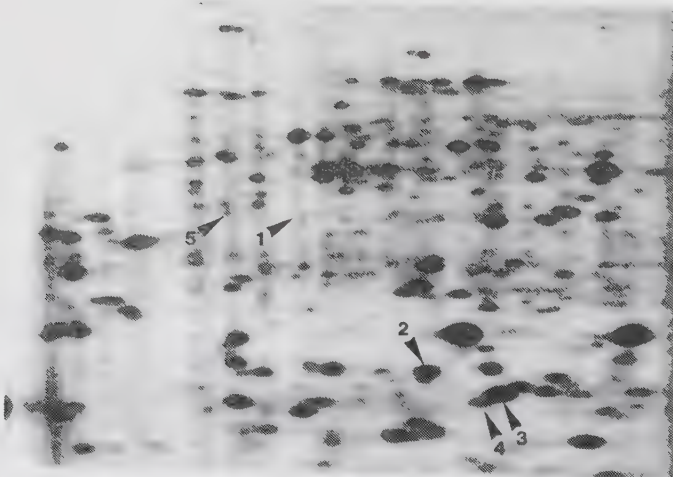


Abb.8b:
2-TU

pH 4

IEF

pH 7 KD

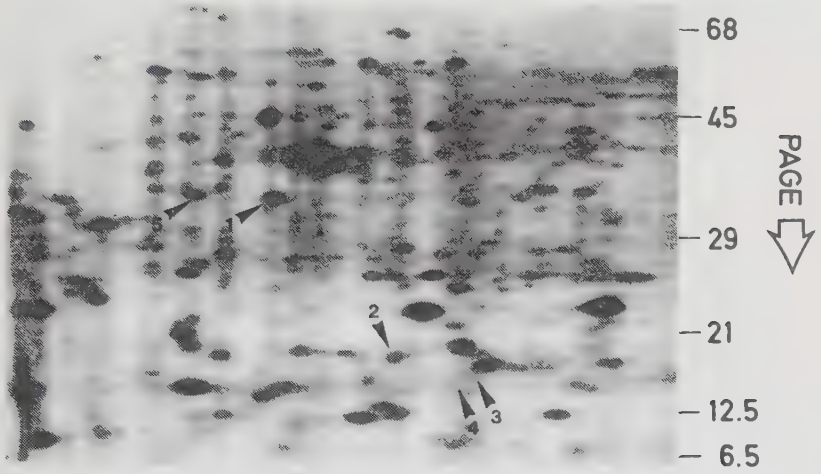


Abb.8c:

2-TU + Nachinfiltration mit Uracil

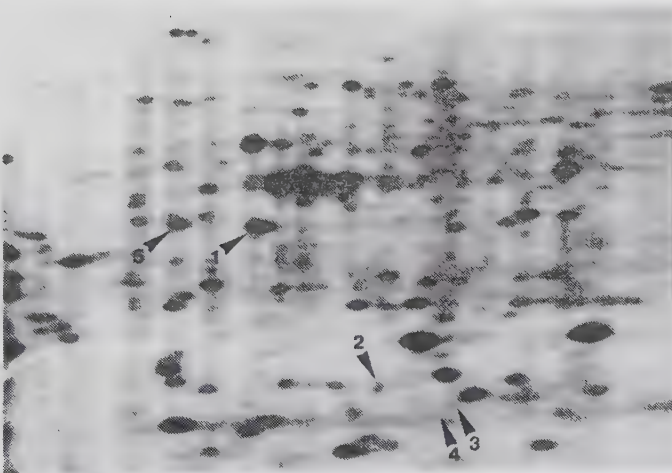


Abb.8d:

5-FU

Tab.6: In vitro-translatierte Polypeptide mit signifikanten quantitativen Veränderungen nach Chemoinduktion der Blütenbildung durch 2-TU (- nicht vorhanden, + bis +++ gering bis stark auftretend). Die Ziffern beziehen sich auf die in Abb. 8 bezeichneten Polypeptide. Die Zahlenangaben sind durch Interpolation gewonnene Schätzwerte aufgrund von Molekulargewichts-Markern sowie den im Gel gemessenen pH-Gradienten.

Polypeptid Nr.	Isoelektri- scher Punkt (pH)	Molekular- gewicht (kDalton)	Stärke des Auftretens				
			KT	2-TU	2-TU+U	5-FU	3 DL
1	5,3	35	+++	-	+++	+++	+++
2	5,7	19	+	+++	-	+	+
3	5,9	13	+	+++	+	-	-
4	5,8	10	-	++	-	-	-
5	5,1	35	+++	+	+++	+++	++

Die Kinetik zeigt bezüglich der quantitativen Veränderungen einzelner Translationsprodukte wiederum jeweils am 3. Tag nach Applikation von 2-TU die stärksten Effekte. Beispielgebend seien die Verläufe für Spot Nr.1 und 2 dargestellt.

Da einer Quantifizierung der "spots" per Auge notwendigerweise eine nicht unerhebliche Fehlerbreite anhaftet und beim Abfotographieren der Röntgenbilder durch die Dunkelkammerprozesse eine weitere Fehlerquelle dazukommt, wurden für diese Kinetik die fraglichen Proteinspots direkt vom Röntgenfilm mittels Laser-Densitometrie gemessen und ihre Größe mit einem geeigneten Datenverarbeitungsprogramm berechnet (LKB UltroScan XL, GelScan XL Software).*

* Die Geräte wurden von LKB, Bromma, zur Verfügung gestellt. Für die geduldige Hilfe bei der Durchführung der Messungen danke ich herzlich Herrn W.Walter und Herrn H.P.Schickle, LKB.

Die Messungen wurden mit einer Auflösung von 70 Meßpunkten/mm² durchgeführt, das bedeutet, daß z.B. für ein Bild aus Abb.9a 14 000 Absorptions-Meßwerte genommen wurden.

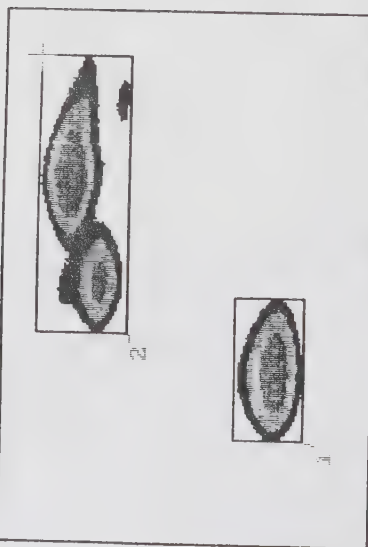
Neben den sich verändernden Polypeptiden wurden stets auch benachbarte, konstante Bereiche als Bezugsgrößen mit dargestellt.

Abb. 9a zeigt den zeitlichen Ablauf der Veränderungen von Polypeptid "Nr.1" aus Abb.8, Abb.9b entsprechend von "Nr.2" (jeweils links unten im Bild, Referenzbereich rechts oben). Die verschiedenen Grauwerte der Graphik stellen die zum Zentrum der "spots" hin zunehmenden Absorptionswerte dar. Die Intensität der einzelnen "spots" ist als Volumen dargestellt, berechnet aus Fläche (mm²) x Höhe (Absorption in A-units). Abb.10 stellt die so ermittelten Werte in Form von Kurvenverläufen dar.

Es zeigte sich, daß das als "Nr.1" bezeichnete Polypeptid bis zum 3.Tag nach 2-TU-Infiltration auf ca. ein Zehntel seines Ausgangswertes (KT-Kontrolle) absinkt, um anschließend bis zum 7.Tag seine ursprüngliche Intensität wiederzuerlangen. Polypeptid "Nr.2" verhält sich genau gegenläufig. Es weist nach 72 Stunden eine drastische Spitze auf, sinkt dann wieder bis nahezu zur Nachweisgrenze ab. (Das Ausmaß dieses Anstiegs wurde von mehreren befragten Personen bei Beurteilung der Fluorogramme per Auge deutlich unterschätzt !)

Mit der Auswahl gerade **dieser** Polypeptide zur densitometrischen Auswertung soll nicht behauptet werden, dies seien die bezüglich der Chemoinduktion der Blütenbildung einzig relevanten Veränderungen in der Proteinbiosynthese. Vielmehr wurden sie deshalb untersucht, weil sie im Zeitraum der Induktion eine besonders deutliche Zu- bzw. Abnahme zeigten. Welche der gefundenen Veränderungen der Translationsprodukte in direktem, welche in nur indirektem Zusammenhang mit der Blütenbildung stehen, läßt sich auf diesem Stand der Untersuchungen noch nicht bestimmen.

KT-Kontrolle

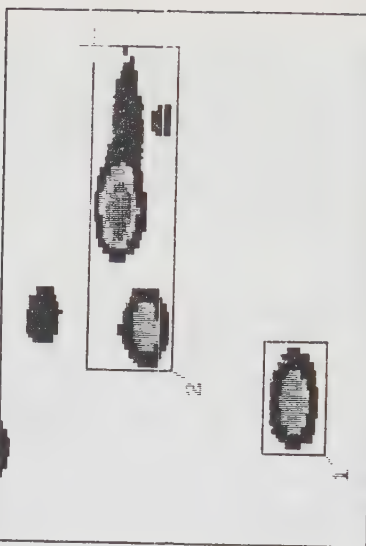


Ref. 0.54 1.20 0.67 1.50 2.45 1.98

Volumen
(A x mm²)

Nr. 1 6,33
Nr. 2 13,59

1 Tag nach 2-TU

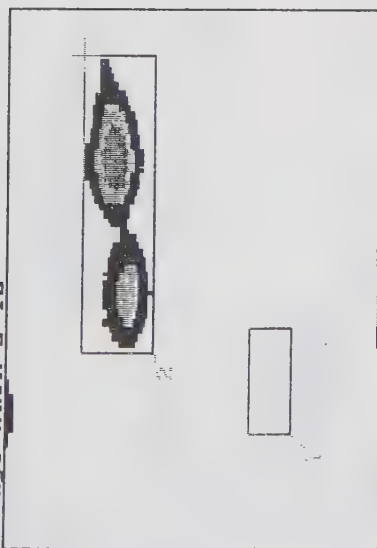


A Ref. 0.51 0.84 0.57 1.17 1.82 1.49

Nr. 1 2,02
Nr. 2 6,21

Abb. 9a

3 Tage nach 2-TU



A 0.54 0.66 1.95
Ref. 0.87 1.24 1.59

Volumen Nr. 1 0,27
(A x mm²) Nr. 2 6,38

5 Tage nach 2-TU



A 0.58 0.64 2.28
Ref. 0.97 1.43 1.86

Nr. 1 0,66
Nr. 2 10,20

Abb. 9a

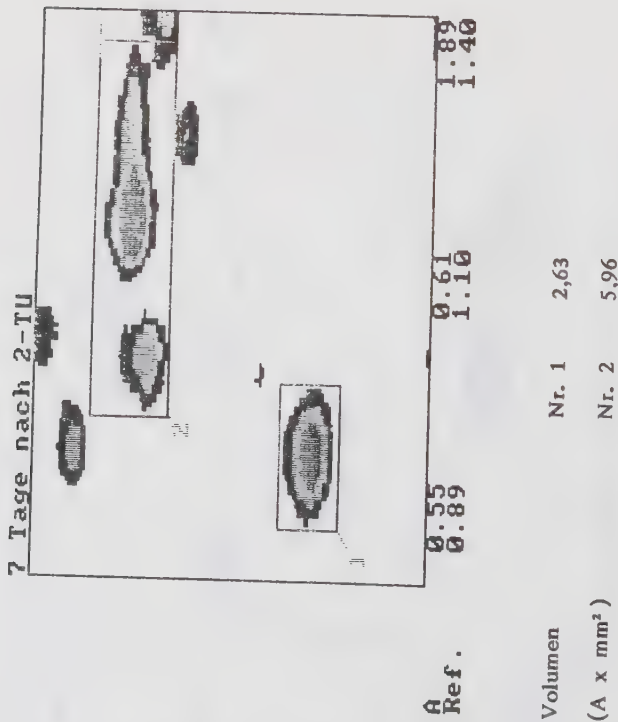


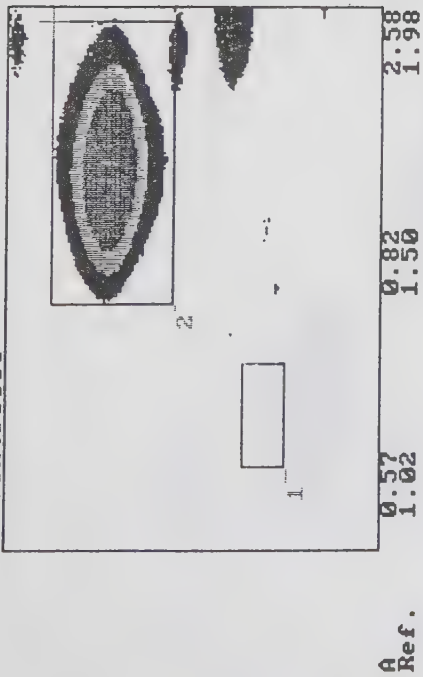
Abb.9a:

Laser-densitometrische Messungen von Fluorogrammen elektrophoretisch aufgetrennter Translationsprodukte nach 2-TU-Infiltration (Ausschnitte).

Das hier mit "1" bezeichnete Polypeptid entspricht "Nr.1" aus Abb.8.

A: minimale, mittlere und maximale Absorption des gemessenen Ausschnitts,
Ref.: Absorptionsgrenzen der Graustufen.
Die Intensität der markierten "spots" ist ausgedrückt als Volumen, berechnet aus Fläche (mm²) x Höhe (=Absorptions-units).

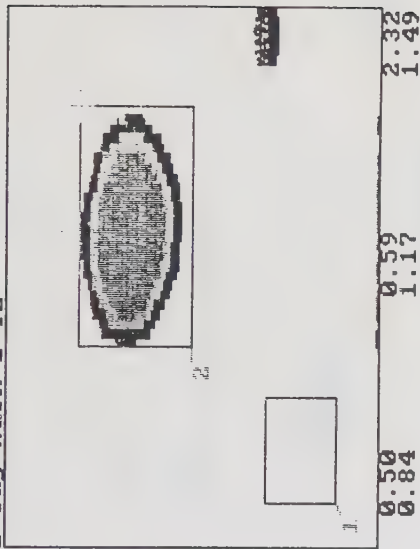
KT-Kontrolle



Volumen
(A x mm²)

Nr. 1	Nr. 2
0,13	17,09

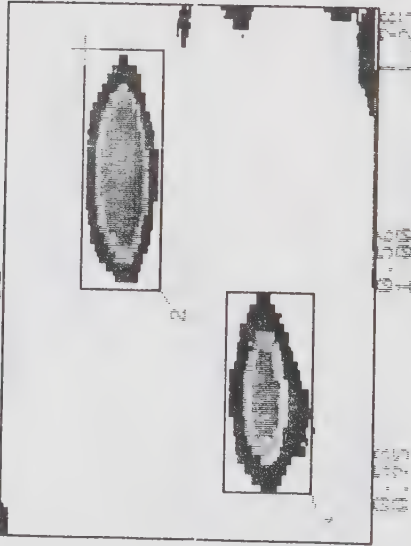
1 Tag nach 2-TU



Nr. 1 0,23
Nr. 2 14,83

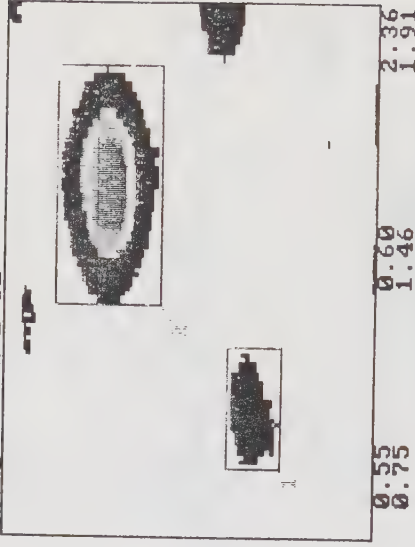
Abb.9b

3 Tage nach 2-TU



A Ref.

5 Tage nach 2-TU

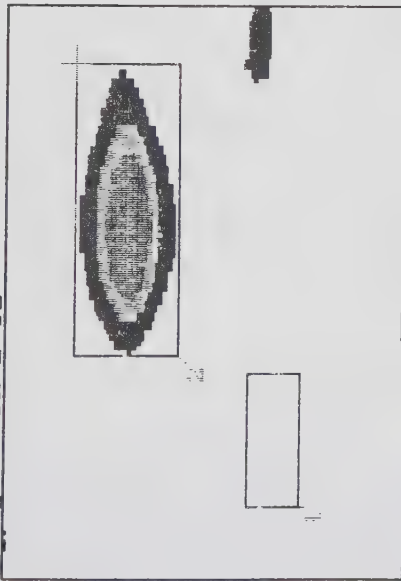


Volumen	Nr. 1	3,86
(A x mm ²)	Nr. 2	6,28

Nr. 1	0,49
Nr. 2	11,35

Abb. 9b

7 Tage nach 2-TU



A 0.51 0.69 2.44
Ref. 0.90 1.48 1.96

Volumen Nr. 1 0,27
(A x mm²) Nr. 2 14,76

Abb.9b:

Laser-densitometrische Messungen von Fluorogrammen elektrophoretischer Auftrennungen von in vitro-Translationsprodukten von Poly(A)-RNA, isoliert zu verschiedenen Zeitpunkten nach 2-TU-Infiltration (Ausschnitte).
Das hier mit "1" bezeichnete Polypeptid entspricht "Nr.2" aus Abb.8.

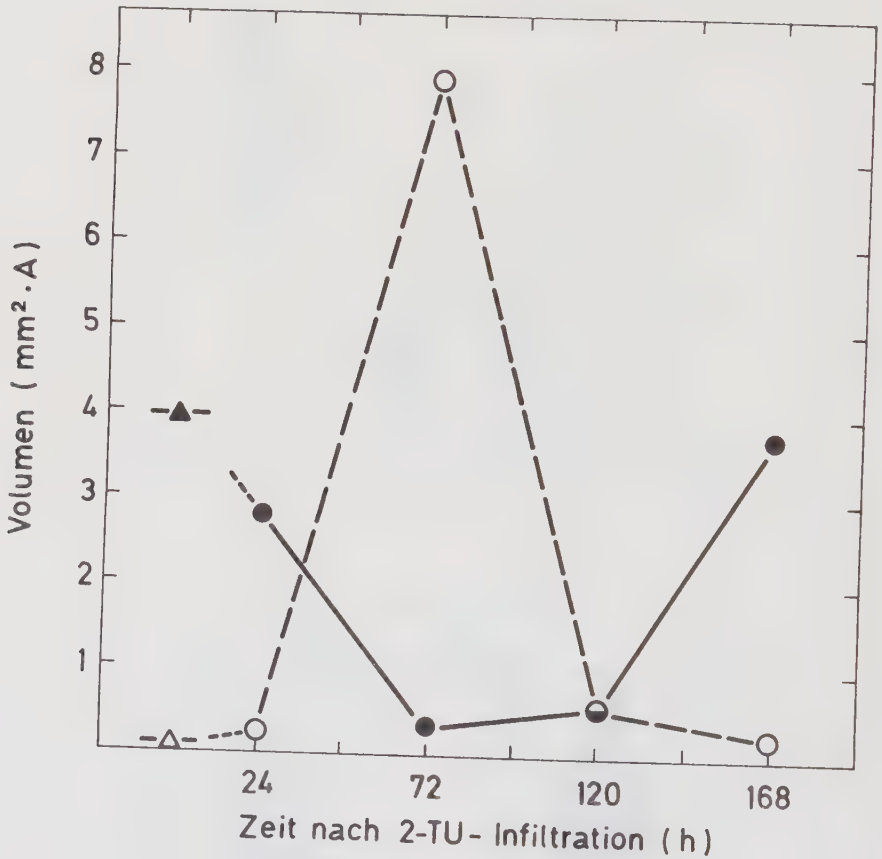


Abb.10:

Intensitätsveränderungen einzelner Polypeptide nach 2-TU-Infiltration.

—●— Nr. 1

- - -○- - Nr. 2

△ bzw. ▲ : KT-Kontrolle

Zweidimensionale elektrophoretische Auftrennungen von Translationsprodukten (Fluorogramme) wurden Laser-densitometrisch gemessen. Die Absorption der Proteinspots wird ausgedrückt als Höhe, die Proteinmenge als Volumen aus Spot-Fläche x Absorption. Die Werte wurden relativiert auf die mittlere Intensität der als Bezugsgrößen ebenfalls gemessenen benachbarten Polypeptide.

III. 3. Diskussion

Die Induktion der Blütenbildung ist bei *Hyoscyamus niger* wie bei zahlreichen anderen Pflanzen photoperiodisch gesteuert. Wie in der Einleitung dargelegt wurde, werden als Mechanismus für die Induktion in den Blättern und für die "Signalübertragung" zum Vegetationspunkt durch stoffliche Komponenten einerseits die Synthese eines "Blühhormons" (Florigen) und andererseits die Blockierung der Synthese eines "Blühhemmstoffes" angenommen; einige Autoren vertreten die Hypothese, daß beide Faktoren an der Induktion beteiligt sind. In welcher Weise können nun die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zur weiteren Aufklärung der angesprochenen Fragen beitragen ?

Entblättert man *Hyoscyamus*-Pflanzen bis auf die Rübe, so bilden sie innerhalb weniger Wochen Blütenanlagen aus, wobei sie keine photoperiodische Abhängigkeit mehr zeigen (LANG und MELCHERS, 1943). Die Autoren zogen daraus den Schluß, daß ein in den Blättern synthetisierter Hemmstoff der Blütenbildung ständig zum Vegetationspunkt transportiert wird und dadurch die Pflanze im vegetativen Zustand hält, werteten die Ergebnisse also als Beweis für die "Hemmstoff-Hypothese". Totalentblätterungen mit anderen Langtagpflanzen (*Nicotiana*, *Rudbeckia*, *Silene*, *Crepis*) führten allerdings zu negativen Ergebnissen, wohl aber weil im Gegensatz zu *Hyoscyamus* keine dieser Pflanzen imstande war, in entblättertem Zustand weiterzuwachsen (Lit. siehe LANG, 1979).

Die von EICHHOFF (1969) mit *Hyoscyamus* durchgeführten Versuche zeigten, daß eine einmalige Entblätterung zu keiner Blütenbildung führt; offenbar können die nachwachsenden Blätter bald die Funktion der entfernten übernehmen. Nach LANG und MELCHERS genügt nämlich schon eine Blattfläche von 1 cm², um eine Blütenbildung unter nicht-induktiven Bedingungen zu verhindern. Dieselben Autoren berichten,

daß bei einigen wenigen Pflanzen schon nach siebentägiger Entblätterung erste Blütenanlagen zu erkennen waren, während bei den meisten Pflanzen eine längere Entblätterung (10-18 Tage) notwendig war. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen einerseits den Befund von EICHHOFF, andererseits aber auch denjenigen von LANG und MELCHERS; allerdings waren bei unseren Versuchen längere Zeiten der Entblätterung zur Induktion der Blütenbildung notwendig.

Obwohl die Auslösung der Blütenbildung durch Entfernen der Blätter - positive Ergebnisse sind auch mit den Kurztagpflanzen *Fragaria*, *Chenopodium* und *Glycine* bekannt (Lit. siehe VINCE-PRUE, 1975) - sicher ein starkes Indiz für die Beteiligung eines spezifischen Blühhemmstoffs ist, sind auch andere Interpretationen nicht völlig von der Hand zu weisen. Möglicherweise verfügt die Pflanze über einen "Alarmmechanismus", der bei extremen Veränderungen ihrer Existenzbedingungen noch eine Selbstreproduktion gewährleistet. Erhält der Vegetationspunkt von den Blättern **keinerlei** Signal irgendeiner Art mehr, könnte dies eine derartige "Notfallreaktion" auslösen.

Bei *Hyoscyamus* kann eine Blütenbildung auch unter photoperiodisch nicht-induktiven Lichtbedingungen durch Applikation von 2-TU in die Blätter ausgelöst werden (EICHHOFF und RAU, 1969). 2-TU wird dabei in die Blatt-RNA eingebaut (s.III.2.2.2.), wie es auch von verschiedenen anderen Autoren berichtet wurde (u.a. TUPY et al., 1965; HESS, 1959; HESLOP-HARRISON, 1960). Der Einbau von Antimetaboliten in die RNA führt aber durch Fehler bei der Transkription und Translation zu Störungen im Zellstoffwechsel. Ausdruck solcher Störungen ist nach LANGEN (1968) eine Hemmung der Proteinsynthese oder die Synthese fehlerhafter, inaktiver Enzymproteine. An verschiedenen Bakterien und Hefen wurde gefunden, daß ein Einbau von 2-TU in die RNA zu einer Hemmung ganz spezifischer Enzyme führen kann (Lit. s. LANGEN, 1968). Nimmt man nun die obligate Anwesenheit eines Blühhemmstoffs für die Erhaltung des vegetativen Zustands der Pflanze an, ließe sich durch eine Blockierung der Hemmstoff-Neusynthese über einen analogen Mechanismus die Auslösung der Blütenbildung durch 2-TU durchaus erklären.

Aus den vorliegenden Ergebnissen über die Revertierbarkeit der 2-TU-Wirkung durch Uracil innerhalb von 3 Tagen ist zu schließen, daß nach diesem Zeitraum im Mechanismus der Induktionsvorgänge offenbar ein "point of no return" erreicht ist und daran anschließende Folgeprozesse durch Eingriffe in den Nukleinsäure-Stoffwechsel nicht mehr beeinflußt werden können.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Reversionswirkung durch Uracil könnte auch auf eine Konkurrenz der beiden Basen um einen Bindungsort hindeuten. Es wäre denkbar, daß die primäre Wirkungsweise von 2-TU nicht in einem kovalenten Einbau in ein stabiles RNA-Molekül besteht, sondern in einer lockeren Bindung an einen Reaktionspartner, die durch nachfolgende Uracilgabe wieder umkehrbar ist. Ein solcher Reaktionspartner könnte beispielsweise ein Enzym sein. Die Wirkung von 2-TU würde dann auf einer kompetitiven Hemmung dieses Enzyms beruhen, sei es durch Blockierung des aktiven Zentrums oder durch allosterische Hemmung. Beispiele für derartige Mechanismen sind für Basenanaloga bekannt: 5-Fluor-desoxyuridin-monophosphat hemmt die Thymidilatsynthetase kompetitiv (HARTMANN und HEIDELBERGER, 1961), verschiedene 5-substituierte Uracile die Dihydropyrimidin-dehydrogenase (SEBESTA et al., 1961), 2-TU Enzyme der Anthocyansynthese (MOHR und SENF, 1966). Unter diesem Gesichtspunkt ist der auch schon von EICHHOFF (1969) geäußerte Gedanke sicher nicht von der Hand zu weisen, "daß Basenanaloga eventuell auch die aktiven Zentren gewisser Proteine, die als Repressoren von Genloci fungieren, besetzen könnten". Ebenso wäre denkbar, daß ein (allosterisch regelbarer) Aktivator eines Genlocus durch 2-TU blockiert und so eine weitere Transkription dieses Gens verhindert werden könnte. Obwohl es dafür bis jetzt noch keine unmittelbaren experimentellen Belege gibt, könnte eine solche **direkte** Beeinflussung der Genaktivität durch 2-TU dessen induzierende Wirkung durchaus schlüssig erklären, sei es über eine Blühhormonsynthese oder über die Blockierung einer Hemmstoffsynthese.

Eine Blattinfiltration mit 2-TU führte in keinem Versuch zu einer 100 %igen Blühinduktion. Wie von COLLINS et al. (1963) vermutet und von PFLIEGLER (1975) durch radioaktive Markierung nachgewiesen, wird infiltriertes 2-TU zu einem geringen Prozentsatz zum Vegetationspunkt transportiert. Am Vegetationspunkt jedoch wirkt 2-TU hemmend auf die Blütenbildung (s. Einleitung). Damit könnte auch die stets unvollständige Induktion in den hier beschriebenen Versuchen verständlich werden.

Im Zusammenhang mit der Wirkung von 2-TU auf die Blatt-RNA geben die Untersuchungen der Poly(A)-RNA konkrete Hinweise auf eine direkte Beteiligung des Translationssystems an der Induktion der Blütenbildung.

An dieser Stelle sei hervorgehoben, daß bei der Darstellung von Versuchsergebnissen stets vermieden wurde, allgemein von "mRNA-Gehalt" zu sprechen. Zwar hat sicher jede Poly(A)-RNA auch messenger-Charakter, aber umgekehrt gilt nicht, daß jede mRNA auch eine Poly(A)-Sequenz haben muß. Neben der plastidären mRNA, die aufgrund ihres prokaryotischen Ursprungs generell keine Poly(A)-Sequenzen aufweist, gibt es auch unter der cytoplasmatischen mRNA bestimmte Spezies, die ohne eine solche Sequenz vorliegen (Lit. s. HALL, 1979). Veränderungen dieser mRNA können also mit der hier verwendeten Methode der Adsorptionschromatographie an Oligo-dT-Cellulose nicht erfaßt werden. Da die Poly(A)-Sequenz dem primären mRNA-Transkript unmittelbar nach der Transkription angehängt wird, lassen sich andererseits über eine Oligo-dT-Säule außer der aktiven (polysomalen) mRNA auch pre-mRNA sowie "maskierte" RNA isolieren.

Im Zuge der Einbauversuche von 2-TU in die RNA war eine deutliche Verringerung des Poly(A)-RNA-Gehalts schon 8 Stunden nach 2-TU-Applikation erkennbar. TOBIN (1979) berechnete für instabile und stabile mRNA aus verschiedenen Geweben Halbwertszeiten der Lebensdauer von 3-7 Stunden bzw. 20-40 Stunden. Eine "Vergiftung" durch Antimetabolite muß sich zuerst auf relativ instabile mRNA-Spezies auswirken und läßt daher die schnelle meßbare Wirkung plausibel erscheinen.

Es wäre denkbar, daß mRNA für einen Hemmstoff, wie er für die Blütenbildung diskutiert wird, zu diesem vergleichsweise kurzlebigen Anteil gehört, da dies für eine gute und schnelle Reaktion auf blühhfördernde Umweltveränderungen von Vorteil sein sollte. Da es Hinweise dafür gibt, daß die mRNA-Stabilität in umgekehrter Relation zu ihrer Größe steht und daß außerdem stabilere mRNAs für kleinere Proteine codieren (PALATNIK, 1980), ließe sich aus obigen Überlegungen vorsichtig folgern, daß es sich bei der diskutierten Hemmstoff-mRNA um ein relativ großes Exemplar handeln müßte, das für ein Protein mit höherem Molekulargewicht codieren könnte.

Obwohl 72 Stunden nach 2-TU-Gabe keine signifikante Abnahme im Poly(A)-RNA-Gehalt zu erkennen ist, wäre es voreilig, daraus zu folgern, 2-TU habe zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluß mehr auf diese RNA-Fraktion. Der deutlich schädigende Einfluß von 2-TU kurz nach seiner Applikation sowie erneut nach 4-5 Tagen läßt eine intermediäre gegenläufige und daher den Abbau "maskierende" Phase einer gesteigerten mRNA-Synthese zumindest wahrscheinlich werden, z.B. im Zusammenhang mit aktivierten repair-Mechanismen. Auch der Befund, daß die Antimetabolite den Gesamt-RNA-Gehalt durchaus verringern, unterstützt diese Vermutung. Es gibt keine Hinweise darauf, daß Poly(A)-RNA gegenüber Hemmstoffen weniger empfindlich sei.

Zur Untersuchung der Zusammensetzung der isolierten mRNA-Populationen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen wurden deren in vitro-Translationsprodukte elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der Interpretation der erhaltenen Gelmuster ist folgendes zu beachten:

Es ist denkbar, daß ein Teil der translatierten mRNAs Fragmente der ursprünglichen mRNA sind. Jedoch ist dies sehr unwahrscheinlich, weil die Methode ein intaktes 3'-OH-Ende (an dem die Poly(A)-Sequenz inseriert) sowie eine intakte Anfangszone am 5'-OH-Ende (die sog. "cap-Sequenz") voraussetzt. Zumindest für das Kaninchen-Reticulozyten-System ist bekannt, daß darin RNA-Bruchstücke nicht translatiert werden (RHOADS et al., 1973).

Allerdings ist nicht auszuschließen, daß Translationsprodukte im Zuge der Aufarbeitung zerbrechen oder sich einzeln synthetisierte Untereinheiten von Proteinen nicht zusammenlagern. Weitgehend übereinstimmende Muster der Auftrennungen sprechen jedoch dagegen, daß dies in großem Umfang passiert, weil dabei eine zufälliger Verteilung der Produkte zu erwarten wäre. Von einer Interpretation von Veränderungen sehr kleiner "spots", besonders im niedermolekularen Randbereich der Auftrennungen, wird hier dennoch Abstand genommen.

Vor allem im mittleren Molekulargewichtsbereich der Auftrennungen ergaben sich nach 2-TU-Infiltration gegenüber KT-Kontrollen einige auffallende Veränderungen im Polypeptidmuster, die offenbar auf eine spezifische Wirkung des 2-TU zurückzuführen sind, weil sie nach 5-FU-Behandlung nicht auftreten.

WARM (1984) fand nach Induktion der Blütenbildung mit Dauerweißlicht bei *Hyoscyamus* einige neu auftretende *in vitro*-Translationsprodukte, von denen zumindest eines mit hoher Wahrscheinlichkeit mit dem von mir als "Nr.2" bezeichneten Polypeptid identisch ist.

Daß die übrigen Veränderungen nicht übereinstimmen, könnte darin begründet sein, daß bestimmte Produkte im Ablauf der photoperiodischen Blühinduktion nur transient auftreten und die Sequenz einzelner Reaktionsschritte bei Licht- und Chemoinduktion nicht mit der gleichen Geschwindigkeit abläuft. Ebenso könnten unterschiedliche Extraktionszeitpunkte erklären, daß bei den in Abb. 18c gezeigten Auftrennungen der Translationsprodukte nach 72 h Dauerweißlicht das oben erwähnte Polypeptid nicht auftritt (WARM extrahierte die Blatt-RNA erst einen Tag nach der dreitägigen induktiven Dauerbelichtung !). Zum Beispiel ist für die Gibberellinsynthese im Zusammenhang mit der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung ein solches vorübergehendes, auf wenige Stunden beschränktes Ansteigen einzelner Gibberelline nachgewiesen (KRIECHBAUM, 1986).

In entsprechenden Kinetikversuchen konnte auch für einige der 2-TU-bedingten Veränderungen der Translationsprodukte nachgewiesen werden, daß sie nur zeitlich eng begrenzt auftreten (beispielhaft dargestellt an einem vorübergehend zunehmenden und einem abnehmenden Polypeptid, s. Abb. 10). Die Maxima der Veränderungen liegen dabei jeweils am 3. Tag nach der Applikation von 2-TU, was ein weiteres Mal diesen Zeitraum im Ablauf der Induktionsvorgänge der Blütenbildung besonders heraushebt.

Die Analyse der Translationsprodukte beweist darüber hinaus, daß die Wirkung des Antimetaboliten 2-TU in der verwendeten Konzentration nicht zu einer allgemeinen Hemmung der Proteinsynthese führt. Vielmehr sind sehr **spezifisch** ganz bestimmte mRNAs betroffen, die nach einer 2-TU-Applikation entweder ihre Matrizeneigenschaft bei der Translation einbüßen oder zu veränderten Polypeptiden führen. Auch das Neuauftreten bestimmter "spots" im Elektrophoresegele könnte durch Veränderungen in der Aminosäuresequenz dieser Translationsprodukte bedingt sein.

Ebenso ist jedoch denkbar, daß ein solches Neuerscheinen von Polypeptiden in direktem Zusammenhang mit einer differentiellen Regulierung der Genaktivität steht. Möglicherweise übt das Polypeptid "Nr.2", das sowohl bei photoperiodischer wie bei Chemoinduktion der Blütenbildung neu auftritt, die Funktion eines Repressors an einem Genlokus aus, der die Synthese eines Blühhemmstoffs steuert.

Abschließend sei eine **Hypothese** dargestellt, mit deren Hilfe die vorliegenden Ergebnisse mit verschiedenen von anderen Autoren vertretenen Vorstellungen über den Mechanismus der Blühinduktion in Einklang gebracht werden könnten.

Wenn man für die Regulation der Blütenbildung nicht nur einen Faktor - das Florigen oder Blühhormon - annimmt, sondern wie einige andere Autoren (z.B. EVANS, 1971; VINCE-PRUE, 1975) ein System aus

zwei Komponenten - einem fördernden Prinzip und einem Blühhemmstoff (v.DENFFER, 1950) - und zusätzlich davon ausgeht, daß der Übergang zur Blütenbildung vom Verhältnis Florigen : Blühhemmstoff abhängt, ließen sich damit die meisten der vorliegenden Ergebnisse schlüssig erklären. Das Verhältnis der beiden Faktoren kann sowohl durch eine Florigensynthese wie durch eine Hemmstoffabnahme gesteigert werden. Während eine photoperiodische Induktion sowohl eine Florigensynthese induzieren wie die Produktion des Blühhemmstoffs blockieren könnte, bewirkt 2-TU möglicherweise nur letzteres. Auch eine Totalentblätterung führt zu einer Hemmstoffbeseitigung. Da in beiden Fällen jedoch keine Induktion der Florigensynthese eintritt, ist weder durch 2-TU-Infiltration noch durch Entblätterung eine 100 %ige Blütenbildung wie nach photoperiodischer Induktion zu erreichen.

IV. EINFLUSS VON UV-B-STRAHLUNG AUF HYOSCYAMUS IM ZUSAMMENHANG MIT DER BLÜHINDUKTION

Im Zuge der aktuellen Umweltdiskussion ist in den letzten Jahren die Problematik einer möglichen Erhöhung von UV-B-Strahlung auf der Erdoberfläche ins Interesse der Öffentlichkeit gerückt (siehe Einleitung). Bisher durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, daß dadurch nicht nur die Photosynthese beeinträchtigt, sondern auch in entscheidendem Maße die "normale" Entwicklung der Pflanzen verändert wird (Lit. bei WELLMANN, 1983).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals geprüft werden, ob die photoperiodische Induktion der Blütenbildung durch Strahlung im UV-B-Bereich beeinflusst wird. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen von UV-B-Strahlung auf den Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel untersucht und nach möglichen Schutzmechanismen der Pflanze gegen UV-Schadwirkungen gesucht.

IV. 1. Bestrahlungseinrichtungen und Strahlungsmessung

Die UV-Bestrahlung der Versuchspflanzen erfolgte in einem selbstgebauten Bestrahlungsfeld in einem abgeschlossenen Raum bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und 70 % rel. Luftfeuchtigkeit. Als UV-Strahlungsquellen dienten UV-B-Leuchtstoffröhren (Philips TL 40 W/12).

Die UV-Strahlung wurde bei allen Versuchen nur zusätzlich zu Weißlicht gegeben. Ein Aggregat mit 16 Leuchtstoffröhren (Osram 58 W/21, Lumilux white) sowie 8 Glühlampen (Osram 15 W) in einem Abstand von ca. 1,20 m über den Versuchspflanzen erbrachte eine Bestrahlungsstärke von ca. 30 W/m^2 bzw. eine Lichtintensität von ca. 10 000 Lux. Da die UV-B-Leuchtstoffröhren auch ein wenig UV-C-Strahlung emittieren (Tab.7), mußte ein geeigneter Filter entwickelt werden, der diese kurzwelligen Strahlungsanteile herausfiltert und dabei die Belichtungsstärke im übrigen Spektralbereich nicht wesentlich reduziert. Nach Prüfung verschiedenster UV-absorbierender Chemikalien und Materialien erwies sich eine mit Uridin getränkte Cellophanfolie (Kalle) als für diese Zwecke am geeignetsten. Eine solche mit einer Uridinlösung von 20 mg/ml durchtränkte und anschließend wieder getrocknete Folie schneidet die Strahlung im UV-B-Bereich sehr "steil" ab, hat aber im gesamten Spektralbereich des sichtbaren Lichtes eine konstant hohe Durchlässigkeit (Abb.11). Die Transmissionseigenschaften eines solchen Filters sind zudem auch bei langen Bestrahlungszeiten mit unseren Lichtquellen sehr beständig. (Nach 360 Stunden Bestrahlung mit der höchsten hier verwendeten UV-Intensität hatte sich das Filterspektrum nur um 2 nm zum Kürzerwelligen hin verschoben). Damit konnte ein wesentlicher Nachteil der von amerikanischen Forschungsgruppen verwendeten Mylar- und Celluloseacetatfolien vermieden werden. Diese müssen wegen nachlassender Transmission im UV-B-Bereich durch die Wirkung von UV-C- und UV-B-Strahlung jeweils nach wenigen Tagen ausgewechselt werden, so daß eine Bestrahlung von Pflanzen mit gleichmäßigen Bestrahlungsstärken über den gesamten Untersuchungszeitraum sehr aufwendig ist (SISSON und CALDWELL, 1975).

Tab.7: Spektrale Emission der verwendeten UV-B-Leuchtstoffröhren
(nach Herstellerangaben)

	Spektralbereich (nm)	Strahlungsfluß (W)
UV-C	< 280	0,01
UV-B	280 - 315	4,7
UV-A	315 - 380	3,0
Licht	380 - 700	0,7

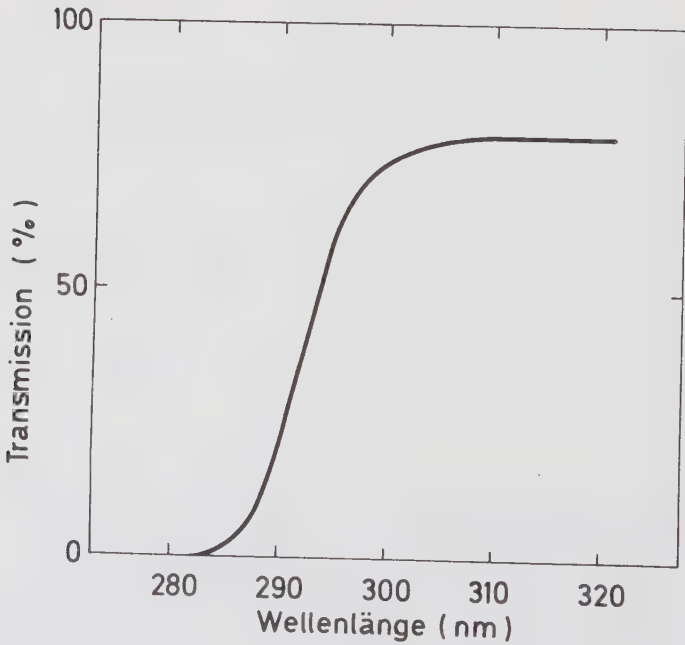


Abb.11:
Spektrale Transmission der verwendeten Uridin-
Cellophan-Filter

Die Strahlungsmessungen im UV- wie im sichtbaren Spektralbereich wurden mit einem Spektroradiometer (Optronic, Modell 742) durchgeführt*. Ausgerüstet mit einem Doppelmonochromator bietet dieses Gerät bei geringsten Bandbreiten eine hohe Meßgenauigkeit besonders auch im UV-Bereich. Die Auswertung der Meßdaten erfolgte mit einem über ein entsprechendes Interface angeschlossenen Tischcomputer (Hewlett Packard Typ 45). In Abb. 12 ist die spektrale Energieverteilung einer UV-Leuchtstoffröhre in Kombination mit dem beschriebenen Uridin-Filter dargestellt.

Da die Grenze im kurzwelligen Bereich erst bei etwa 284 nm liegt, trifft auf die Versuchspflanzen auch Strahlung von so kurzen Wellenlängen auf, wie sie bisher unter natürlichen Bedingungen nur in extremen Höhenlagen gemessen wurde. Da jedoch die Wellenlänge der Quanten, die auf die hier untersuchten physiologischen Abläufe am effektivsten bzw. am schädlichsten einwirken, nicht bekannt ist, wurde die per definitionem festgelegte untere Grenze des UV-B einzuhalten versucht. Gerechtfertigt scheint eine Überschreitung der heute existierenden kurzwelligen Grenze der Strahlung auf der Erdoberfläche auch aufgrund der Prognose, daß eine Reduktion der atmosphärischen Ozonschicht zu einer Verschiebung der Spektralgrenze zum Kürzerwelligen hin führen wird (siehe Einleitung).

Da es nicht möglich ist, mit künstlichen Strahlungsquellen ein dem Sonnenlicht völlig entsprechendes Emissionsspektrum zu erzielen, wird in verschiedenen Forschungsgruppen eine "Wichtung" der Strahlung nach ihrer biologischen Wirksamkeit vorgenommen, z.B. basierend auf Wichtungsfunktionen für die DNA-Schädigung nach SETLOW (1974) oder für die sog. "allgemeine Pflanzenwirksamkeit" nach CALDWELL (1971).

* Das Gerät stellte Prof. Tevini (Universität Karlsruhe) freundlicherweise zur Verfügung, wofür ich an dieser Stelle herzlich danke. Für die Hilfe bei der Durchführung der Messungen danke ich Herrn D. Steinmüller.

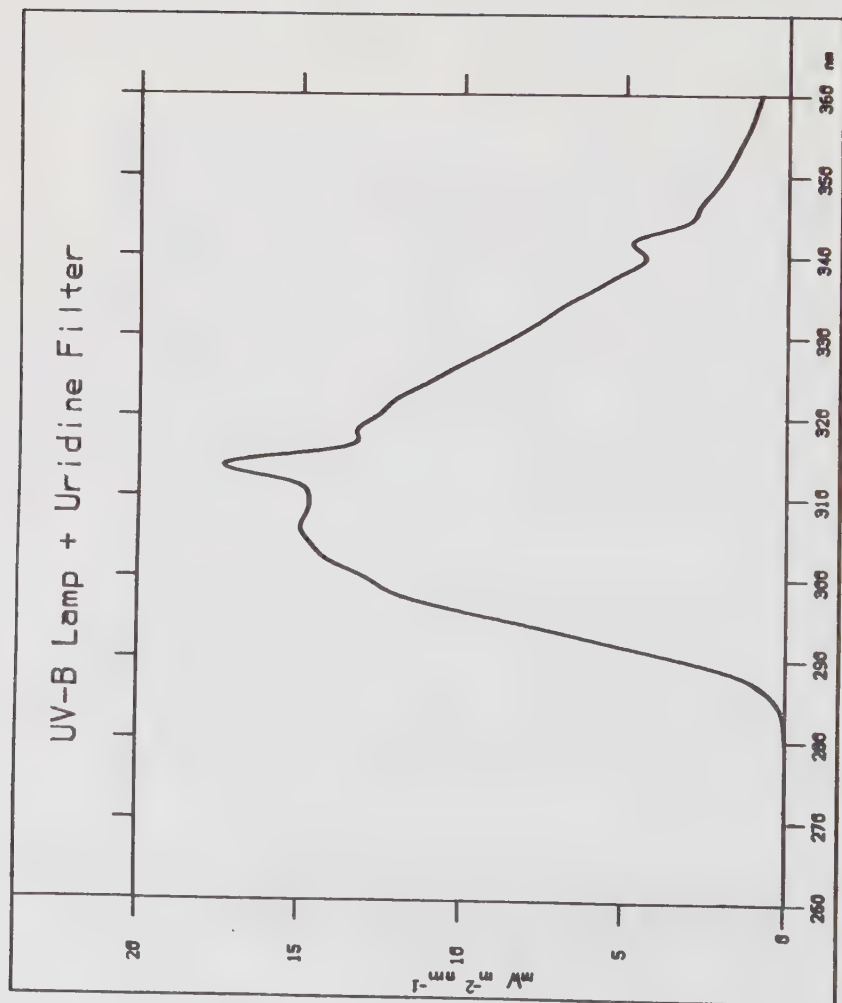


Abb.12:

Spektrale Energieverteilung der verwendeten Strahlung im UV-Bereich

Eine korrekte Anwendbarkeit solcher Wichtungsfunktionen ist jedoch nur gewährleistet, wenn nun wiederum die in den verschiedenen Versuchen verwendeten Strahlungsquellen in ihren Emissionsspektren genau derjenigen entsprechen, mit der die Wichtungsfunktion ausgearbeitet wurde. Außerdem wurde z.B. das Caldwell'sche Wichtungs-Wirkungsspektrum monochromatisch erstellt, womit es sicherlich nicht vergleichbar ist mit Versuchen, in denen ein größerer Wellenlängenbereich gleichzeitig eingestrahlt wird. Bei Untersuchungen zur Mutagenität von Fibroblasten etwa, bei denen UV-B wie in unserem Fall in Kombination mit Weißlicht verwendet wurde, lagen die gemessenen Werte stets um einen Faktor 3-6 höher als die mit Hilfe verschiedener Wichtungsfunktionen berechneten Werte (persönliche Mitteilung von Prof. Kiefer, Gießen).

Eine Wichtung der Strahlungswirkungen scheint mir generell nur möglich, wenn Photorezeptor bzw. Angriffsort dieser Strahlung genau bekannt sind. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf jedwede Wichtung der den Pflanzen verabreichten Strahlung verzichtet.

IV. 2. Einfluß von UV-B auf die Induktion der Blütenbildung

IV. 2.1. Belichtungsanordnung

Die UV-B-Leuchtstoffröhren wurden entweder für 10 h täglich dem Weißlicht-Kurztag zugeschaltet, oder sie ergänzten kontinuierlich das zur Induktion der Blütenbildung applizierte Dauerlicht.

In einigen Versuchen wurde auch während Dauer-Weißlichtbestrahlung UV-B nur in Kurztagintervallen gegeben, um die auf die Pflanzen auftreffende Strahlungsmenge (Bestrahlungsstärke $\times$ Zeit) mit der für Versuchsgruppen unter KT-Bedingungen vergleichen zu können.

Die verschiedenen verwendeten Bestrahlungsintensitäten wurden durch Ummantelung der UV-B-Röhren mit unterschiedlich durchlässigen Aluminiumlochplatten sowie durch Variation des Abstands der Röhren

zu den Pflanzen erreicht. Die genaue Bestimmung der bei der jeweiligen Versuchsanordnung auf Höhe der Blätter herrschende UV-B-Bestrahlungsstärke ($\text{mW}\cdot\text{m}^{-2}$) erfolgte durch Integration des Spektrums (aufgenommen mittels Spektorradiometer) im Bereich 280–320 nm.

IV.2.2. Ergebnisse

IV.2.2.1. UV-B vor, während und nach induktivem Dauer-Weißlicht

Zur Klärung der Frage, ob eine zusätzliche UV-B-Bestrahlung die photoperiodische Induktion der Blütenbildung in irgendeiner Weise beeinflusst, wurde in ersten Versuchen UV-B mit einer Bestrahlungsstärke von ca. $2 \text{ W}/\text{m}^2$ während 3 Tagen Dauerweißlicht eingestrahlt. Dieser Zeitraum ist bei *Hyoscyamus* gewöhnlich ausreichend, um in nahezu allen Pflanzen eine Blütenbildung zu induzieren (WARM und RAU, 1982). Durch das zusätzliche UV-B wurde jedoch die Blütenbildung vollständig gehemmt. Das gleiche Resultat war zu verzeichnen, wenn die UV-B-Bestrahlung unter KT-Bedingungen unmittelbar vor der induktiven Dauerbelichtung gegeben wurde. Auch im Anschluß an induktive Lichtbedingungen gegeben, verhinderte UV-B eine Blühinduktion fast völlig. In einer Kontrollgruppe mit zweiwöchiger UV-B-Bestrahlung ausschließlich während KT-Belichtung entwickelte keine der Pflanzen Blütenanlagen, ein Hinweis darauf, daß UV-B keine "Streßblüte" hervorruft. In Tab. 8 sind die Ergebnisse nach den verschiedenen Belichtungsprogrammen zusammengefaßt.

Die Hemmung der Blühinduktion durch vorangehende Kurztage mit UV-B ließ sich jedoch kompensieren durch eine unter normalen Bedingungen stärkere Induktion, d.h. durch eine längere Dauerbelichtung (Tab.9).

Durch die Einwirkung von UV-B-Strahlung wird also offenbar die Induktionsschwelle für die Blütenbildung heraufgesetzt, d.h. die Pflanzen verlieren an photoperiodischer Sensitivität.

Tab.8: Hemmung der Blühinduktion durch zusätzliches UV-B (Bestrahlungsstärke ca. 2 W/m^2) vor, während oder nach einer Schwelleninduktion mit Dauerweißlicht.

Bestrahlungsprogramm (Tage)	Zahl der Pflanzen	Blütrate (%)
KT ----- 3 DL ----- KT	42	95
KT ----- 3 DL + UV - KT	17	0
3 KT + UV -- 3 DL ----- KT	23	0
KT ----- 3 DL ---- 14 KT + UV	19	5
14 KT + UV ----- KT	17	0

Tab.9: Hemmung der Blühinduktion durch zusätzliches UV-B (Bestrahlungsstärke ca. 2 W/m^2) während Kurztagen, unmittelbar vor unterschiedlich langen induktiven Dauerlicht-Zyklen (ohne UV-B) gegeben.

Bestrahlungsprogramm (Tage)	Zahl der Pflanzen	Blütrate (%)
KT ----- 3 DL	42	95
3 KT + UV ----- 3 DL	23	0
3 KT + UV ----- 4 DL	10	40
3 KT + UV ----- 5 DL	10	80
3 KT + UV ----- 6 DL	10	100

IV. 2.2.2. Abhängigkeit von der UV-B-Bestrahlungsstärke

Im Zusammenhang mit der Diskussion einer Erhöhung der UV-B-Strahlung durch Reduktion der Ozonschicht war von besonderem Interesse, in welchem Maß sich auch noch niedrige UV-B-Bestrahlungsstärken auf die Blütenbildung auswirken. Die Ergebnisse von Versuchen mit stufenweise erniedrigten UV-B-Intensitäten, dargestellt in Abb. 13, zeigen eine deutliche Abhängigkeit des induktionshemmenden Effekts von der UV-B-Bestrahlungsstärke. Noch die geringste der hier verwendeten UV-B-Intensitäten (nur 100 mW/m^2) führte zu einer solch starken Schädigung des Induktionsmechanismus, daß selbst 5 Tage Dauerlicht nicht mehr zu einer vollständigen Blühinduktion ausreichten.

Es muß betont werden, daß unter den angewandten Bestrahlungsbedingungen keinerlei äußerlich sichtbare Schädigung der Pflanzen erkennbar war. Eine "Bronzierung" der Blätter, wie sie bereits von BENDA (1955) als Folge von UV-Bestrahlung beschrieben wurde, trat unter unseren Versuchsbedingungen bei *Hyoscyamus* erst auf, wenn UV-B mit der höchsten Intensität (2 W/m^2) länger als 72 h kontinuierlich eingestrahlt wurde. Eine solche Braunfärbung der Blätter wird einer vermehrten Tanninproduktion oder der Bildung von Kork- und Holzzellen unmittelbar unter abgestorbenen Epidermiszellen zugeschrieben (Lit. bei LOCKHART und BRODFÜHRER-FRANZGROTE, 1961). Ein Ausbleichen oder Einrollen der Blätter, wie es ebenfalls als UV-Schadbild beschrieben wird, trat auch bei 4 Tagen Dauerbestrahlung mit 2 W/m^2 UV-B nicht auf (Beobachtungen aus anfänglichen, orientierenden Versuchen).

Da sichtbare Schädigungen am Habitus der Pflanze auch eine Beeinträchtigung ihrer Entwicklung vermuten lassen, wäre unter solchen Umständen eine Hemmung der Blütenbildung möglicherweise nur ein Sekundäreffekt einer allgemeinen Schädigung. Um dies weitgehendst auszuschließen, wurden alle im Folgenden beschriebenen Untersuchungen nur unter Bestrahlungsbedingungen durchgeführt, die das Kriterium: "keine äußerlich sichtbare Schädigung" erfüllten.

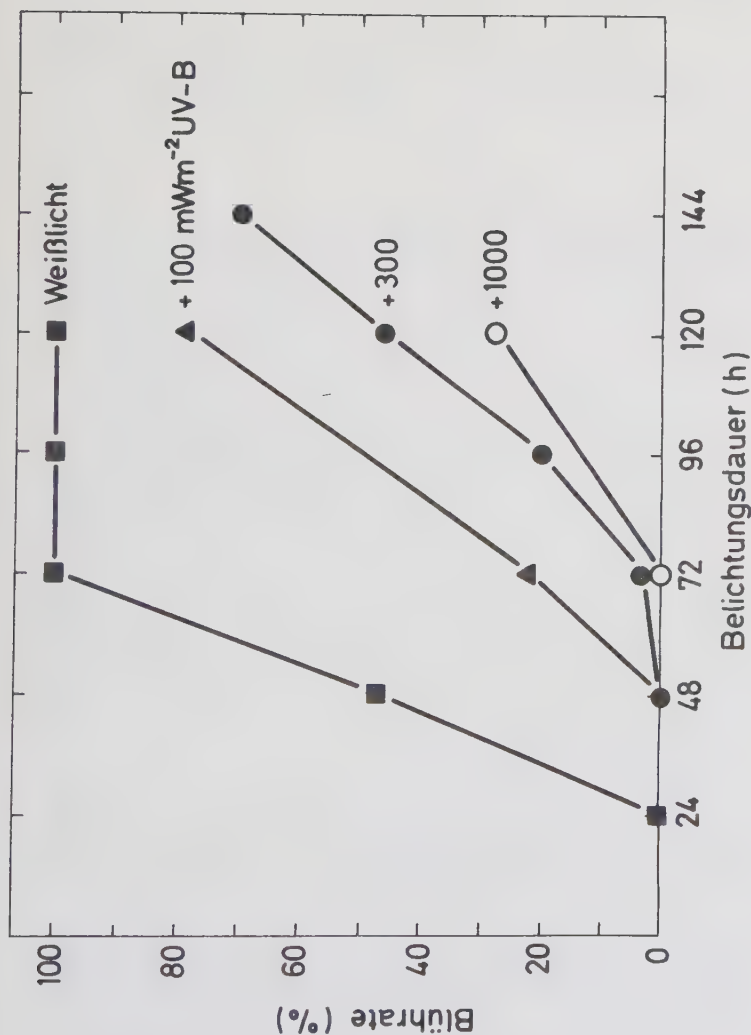


Abb.13:

Induktion der Blütenbildung durch Dauer-Weißlicht mit zusätzlichem UV-B verschiedener Bestrahlungsstärken.
(Zusammenfassung von 3 Versuchen mit insg. 25-45 Pflanzen pro Versuchsgruppe)

IV. 3. Einfluß auf die Blattpigmente

Auf der Suche nach möglichen Angriffsorten und Wirkungsmechanismen der UV-B-Strahlung wurden zunächst die Blattpigmente näher untersucht. Auch hinsichtlich möglicher Schutzreaktionen sollte die Bestimmung von Pigmentgehalten Aufschluß darüber geben, ob und in welchem Maß die Pflanze damit einer solch hohen Strahlenbelastung begegnen kann.

IV. 3.1. Chlorophylle und Carotinoide

Die Chlorophylle und Carotinoide wurden untersucht, um mögliche unspezifische Schädigungen der Pflanze, die äußerlich nicht sichtbar sind, zu erfassen. Während der Chlorophyllgehalt als ein direkter Parameter für die photosynthetische Leistungsfähigkeit der Pflanze gelten kann, sind die Carotinoide neben ihrer Rolle als Photosynthesepigmente noch in einer anderen Hinsicht von Bedeutung: Sie können aufgrund ihrer Struktur leicht photooxidiert werden und damit die aktiven Zentren des LHC (light harvesting complex) schützen (KRINSKY, 1979).

In ersten Vorversuchen wurden die Chlorophylle mit kaltem 80 %igem Aceton extrahiert unter Zugabe einer Spatelspitze $MgCO_3$, um Phaeophytinbildung weitgehend zu vermeiden. Die photometrische Bestimmung von Chl a und Chl b erfolgte nach den Formeln von ZIEGLER und EGLE (1968) :

$$\text{Chl a (mg/l)} = 11,78 E_{664} - 2,29 E_{647}$$

$$\text{Chl b (mg/l)} = 20,05 E_{647} - 4,77 E_{664}$$

Die dabei erhaltenen Meßwerte, aufgeführt in Tab.10, machen deutlich, daß unter unseren Bestrahlungsbedingungen UV-B offenbar keinen Einfluß auf die Chlorophyllgehalte voll entwickelter Blätter hat.

Unter dieser Voraussetzung wurden zur Untersuchung des Carotinoidgehalts die lipophilen Blattpigmente, also Carotinoide und Chlorophylle, ohne vorherige Auftrennung quantitativ bestimmt. Eine signifikante Änderung der Carotinoide sollte sich auch neben einem konstanten Chlorophyllniveau

Tab.10: Chlorophyllgehalte voll entwickelter Blätter nach UV-B-Bestrahlung (ca. 2 W/m²), bezogen auf die Blattfläche.
(Extraktion und Berechnung nach ZIEGLER und EGLE, 1968).

	Weißlicht	Weißlicht + zusätzliches UV-B		
	72 h	24 h	48 h	72 h
Chl a (mg/cm ²)	1,39 1,59	1,50 1,38	1,46 1,43	1,45
Chl b (mg/cm ²)	0,35 0,41	0,39 0,36	0,35 0,31	0,36

erkennen lassen, zumal als zusätzliche Kontrolle das Verhältnis der beiden Pigmentklassen zueinander durch Vergleich der Gesamtspektren der Extrakte ständig überprüft werden konnte.

Zur Extraktion der lipophilen Pigmente wurde ein vollentwickeltes Blatt (ca. 1 g Frischgewicht, ohne Mittelrippe) nach vorheriger Bestimmung seiner Fläche in 20 ml Methanol (p.A.) zerrieben, dann in einem Plastikbecher mit Glasperlen 30 min im Dunkeln geschüttelt. Nach Zugabe von 20 ml Aceton (p.A.) und weiterem Schütteln wurde der Extrakt über eine Glasfilterfritte von Blattgeweberesten befreit und mit Hilfe einer 20 %igen Ammonsulfatlösung in einem Scheidetrichter in Petrolether (Kp. 40-60°C) übergetrieben. Ausführlich beschrieben ist diese Methode bei SCHROTT et al. (1981). Die Petroletherphase wurde zur Trockne eingengt und in 10 ml Petrolether (Kp. 60-80°C) aufgenommen. Von einer 1:10-Verdünnung dieses sehr intensiv gefärbten Extrakts wurde die spektrale Absorption im Bereich 380-700 nm gemessen (Contron, Uvicon 820 Spektralphotometer). Zur Auswertung wurden die Meßdaten an einen Personalcomputer (Contron, Psi 80) übertragen. Da quantitative Bestimmungen

anhand von Absorptionsmaxima bei einem Gemisch mehrerer Pigmente wechselnder Zusammensetzung nur eine geringe Aussagekraft haben, wurde der Pigmentgehalt des Blattextraktes durch Integration der gemessenen Absorptionskurve ermittelt ("Compare"-Softwareprogramm von Contron).

Als Bezugssystem für die so errechneten Gehalte an lipophilen Pigmenten schien die Blattfläche geeigneter als das Frischgewicht der Probe, da auch in scheinbar gleich turgeszenten Blättern eine Schwankung des Wassergehalts in gewissen Grenzen nicht auszuschließen ist.

Die Ergebnisse, zusammengestellt in Tab.11, zeigen, daß UV-B-Bestrahlungsstärken bis hinauf zu 1000 mW/m² und den Pflanzen bis zu 7 Tage lang appliziert, keinen Einfluß auf die Menge der lipophilen Pigmente bzw. auf die Carotinoide haben.

Die Befunde von TEVINI und IWANZIK (1982), die eine UV-B-bedingte Reduktion sowohl des Chlorophyll- wie auch des Carotinoidgehalts bei verschiedenen Mono- und Dikotylen feststellen konnten, stehen mit den an *Hyoscyamus* gewonnenen Daten nicht notwendigerweise im Widerspruch. Zum einen arbeiteten die genannten Autoren stets mit Keimlingen, die ja allgemein empfindlicher reagieren dürften, zum anderen fanden sie große Unterschiede in der UV-Empfindlichkeit zwischen den verschiedenen Pflanzenarten, und schließlich gaben sie an, daß unter den höchsten von ihnen verwendeten UV-B-Bestrahlungsstärken regelmäßig eine starke Bronzierung der Blätter zu beobachten war, also eine allgemeine, tiefgreifende Schädigung der Pflanzen stattgefunden hatte.

In anderen Untersuchungen dagegen wurden ebenfalls keine signifikanten Erniedrigungen des Chlorophyllgehalts der Pflanzen durch UV-B-Bestrahlung gefunden (SISSON und CALDWELL, 1976; TERAMURA et al., 1980; TERAMURA und CALDWELL, 1981).

Tab.11: Gehalt lipophiler Pigmente (Carotinoide und Chlorophylle) in den Blättern nach Bestrahlung mit UV-B unterschiedlicher Strahlungsstärke in Kombination mit Dauerweißlicht (DLw). Angaben als relative Spektrumsfläche (380-700 nm), bezogen auf 1cm² Blattfläche; Mittelwerte aus 4 Versuchen unter Angabe der Standardabweichung.

Belichtungsdauer (h)	24	48	72	120	168
DLw					
+ 100 mWm ⁻² UV-B	0,508 ± 0,026*	0,504 ± 0,029	0,501 ± 0,045	0,544 ± 0,022	0,557 ± 0,019
+ 300 mWm ⁻² UV-B	0,478 ± 0,034	0,479 ± 0,036	0,492 ± 0,024	0,498 ± 0,034	0,510 ± 0,017
+1000 mWm ⁻² UV-B	0,505 ± 0,020	0,481 ± 0,024	0,528 ± 0,019	0,523 ± 0,029	0,523 ± 0,015
KT-Kontrolle	0,515 ± 0,057	0,505 ± 0,043	0,468 ± 0,042	0,453 ± 0,042	0,476

* Standardabweichung

IV. 3.2. Anthocyane

In verschiedenen Pflanzenarten konnte durch UV-B-Bestrahlung eine Erhöhung des Anthocyangehalts festgestellt werden (Lit. bei WELLMANN, 1983). Dies wurde als Schutzreaktion der Pflanze gegen drohende Strahlenschädigungen interpretiert.

Hyoscyamus bildet auch unter normalen Lichtbedingungen ein gewisses Maß an Anthocyanen, leicht ersichtlich an einer deutlichen Violett-färbung des Blattgrunds. Um festzustellen, ob der Pflanze eine Steigerung dieser Synthesefähigkeit als eventueller Schutzmechanismus gegen die verwendete UV-B-Strahlung zur Verfügung steht, wurde der Anthocyan-Gehalt von Blattgewebe nach unterschiedlich langer Bestrahlung mit verschiedenen UV-B-Intensitäten bestimmt.

Die Extraktion der Anthocyane erfolgte nach LINDOO und CALDWELL (1977). Mit einem Korkbohrer wurden jeweils 20 Scheibchen (1 cm Durchmesser) aus der Blattspreite ausgestochen und in einem Kölbchen mit 10 ml Extraktionsmedium (Methanol-Wasser-konz .HCl im Verhältnis 80 : 20 : 1) im Dunkeln und in einem Eisbad geschüttelt. Nach 48 h wurde der Extrakt abfiltriert (Filterpapier Whatman No.1), auf ein definiertes Volumen eingestellt und im Photometer bei 530 nm und 657 nm gemessen. Aus den Absorptionswerten wurde die Anthocyan-Konzentration nach der Formel von MANCINELLI et al. (1975) berechnet:

$$[A] = A_{530} - 1/3 A_{675}$$

Die auf die Blattfläche bezogenen $[A]$ -Werte sind in Tab. 12 zusammengestellt.

Mit der Umstellung auf Dauerbelichtung ist gegenüber dem KT-Wert eine Erhöhung des Anthocyangehalts in den Blättern verbunden, die jedoch durch UV-B der verwendeten Bestrahlungsstärken im Versuchszeitraum nicht meßbar beeinflusst wurde.

Tab.12: Anthocyangehalte in den Blättern nach Bestrahlung mit Dauerweißlicht (DLw) in Kombination mit UV-B unterschiedlicher Bestrahlungsstärken. Angaben in [A]/cm² Blattfläche, Mittelwerte aus 3 Versuchen.

Belichtungsdauer (h)	24	48	72	96	120	168
DLw	1,21 ± 0,09*	1,23 ± 0,24	1,49 ± 0,10	1,69 ± 0,38	1,80 ± 0,43	1,91 ± 0,09
+ 100 mW/m ² UV-B	1,27 ± 0,27	1,29 ± 0,20	1,31 ± 0,18	1,78 ± 0,73	1,72 ± 0,23	1,82 ± 0,05
+ 300 mW/m ² UV-B	1,21 ± 0,0	1,36 ± 0,28	1,59 ± 0,28	1,59 ± 0,72	1,68 ± 0,10	1,75 ± 0,41
+ 1000 mW/m ² UV-B	1,24 ± 0,05	1,23 ± 0,32	1,63 ± 0,22	1,78 ± 0,28	1,87 ± 0,24	1,91 ± 0,36
KT-Kontrolle	1,21 ± 0,0	-	-	-	-	1,27 ± 0,18

* Standardabweichung

IV. 3.3. Andere Flavonoide

Eine Induktion der Flavonoidbiosynthese durch UV-B-Strahlung bei einigen Umbelliferenarten wurde von WELLMANN (1971, 1983) berichtet, der darin einen Schutzmechanismus der Pflanze gegen eine UV-Schädigung vermutet. Es stellte sich die Frage, ob auch bei Hyoscyamus die Flavonoidsynthese durch UV-B-Strahlung beeinflußt wird.

Die Extraktion und quantitative Bestimmung der Flavonoide erfolgte nach DUELL-PFAFF und WELLMANN (1982). 0,5 g Blattmaterial wurden bei Raumtemperatur in 8 ml 0,05 M Boratpuffer, pH 8,8, zerrieben und das Homogenat bei 18 000 Upm 20 min zentrifugiert (Beckman, Rotor JA 20). Aus dem Überstand wurde der Flavonoidgehalt durch Messung der Absorption bei 370 nm bestimmt (Beckman Model 24 Spectrophotometer).

Die Ergebnisse (Abb.14) zeigen, daß unter Dauerweißlicht der Flavonoidgehalt in den Blättern nur sehr geringfügig ansteigt, während zusätzliches UV-B eine drastische Erhöhung bewirkt, und zwar abhängig von der Bestrahlungsstärke. Während bei 100 mW/m² UV-B ein positiver Effekt erst ab dem 5. Tag meßbar ist, führen 300 mW/m² UV-B zu einer schnellen und kontinuierlichen Zunahme im Pigmentgehalt, deren Ausmaß aber bei einer Bestrahlung mit 1000 mW/m² UV-B nicht mehr erreicht wird. Möglicherweise tritt bei dieser Intensität bereits eine Schädigung der Biosynthesekapazität auf, die einen eventuell stärkeren induktiven Effekt "maskiert".

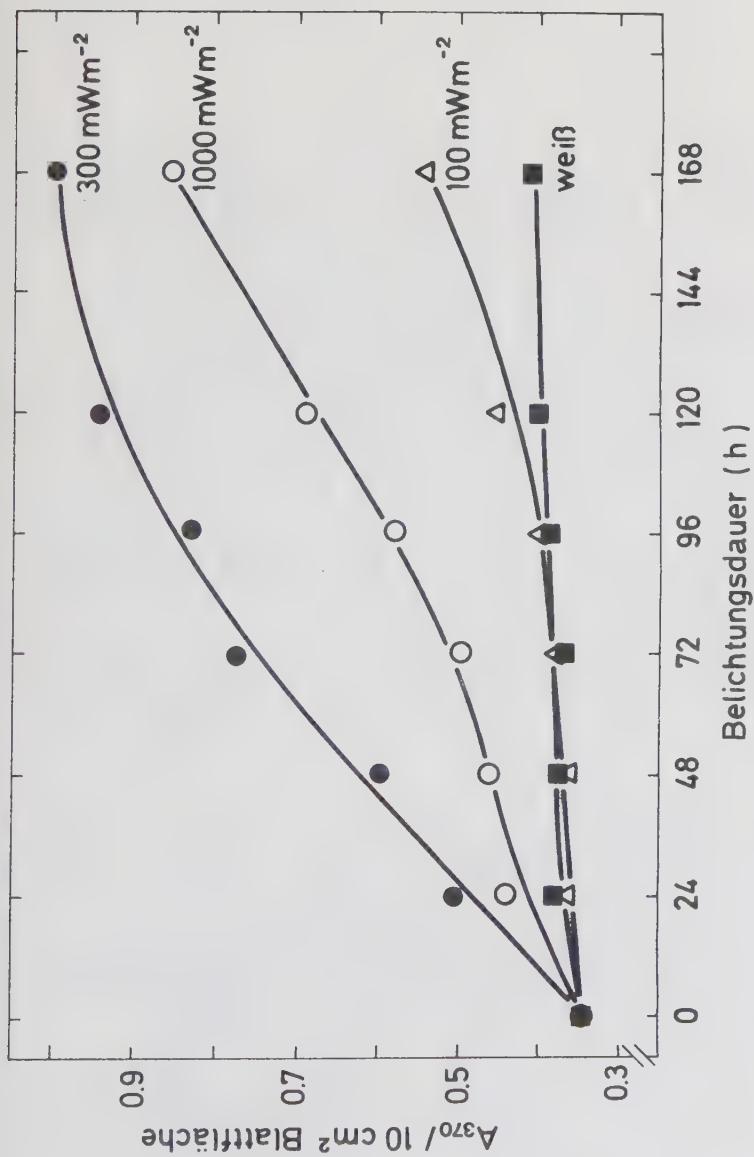


Abb. 14:

Flavonoidgehalte in den Blättern im Dauerweißlicht mit und ohne zusätzlichem UV-B unterschiedlicher Bestrahlungsstärke (6 Versuche).

IV. 4. Einfluß auf den Proteingehalt der Blätter

Um äußerlich nicht sichtbare Schädigungen durch die UV-B-Bestrahlung feststellen zu können, wurde als ein weiterer Parameter der Proteingehalt der Blätter untersucht.

Zur Extraktion wurde 1 g Blattmaterial (Frischgewicht) in 5 ml 0,04 M Na-Acetatpuffer, pH 5,5 mit 0,2 M NaCl und 5 % (w/v) PVP (nach AWAD und YOUNG, 1979) homogenisiert und nach 15 min Stehen bei Raumtemperatur mit 10 000 Upm 20 min lang abzentrifugiert (Beckman, JA 20 Rotor). Aus dem Überstand wurde eine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung bis 80 % Sättigung durchgeführt, der Niederschlag wie oben 10 min lang abzentrifugiert und mit einer gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung nochmals gewaschen. Anschließend wurde der Niederschlag in 6 ml Extraktionspuffer (ohne NaCl) aufgenommen und mit daraus entnommenen Aliquots eine Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) durchgeführt. Die Methode beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G 250 an Protein in saurem Milieu unter Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm. Als Proteinstandard dienten jeweils 0,1 ml Rinderserumalbuminlösung (1 mg/ml).

In 5 Versuchen standen jeweils 20 Pflanzen während 9 Tagen im Dauerweißlicht mit zusätzlichem UV-B unterschiedlicher Bestrahlungsstärke (100, 300, 1000 mW/m²). Kontrollgruppen erhielten nur Weißlicht ohne UV-B.

Es zeigte sich, daß durch eine Zusatzbestrahlung mit UV-B der Proteingehalt der Blätter über den Versuchszeitraum von 9 Tagen hinweg nicht meßbar beeinflusst wird (Tab.13). Auch die auf den ersten Blick etwas erniedrigt scheinenden Werte nach Bestrahlung mit 1000 mW/m² UV-B liegen innerhalb der Schwankungsbreite der Meßdaten, wie die Berechnung der Standardabweichungen sowie der statistische Test belegen.

Tab.13: Proteingehalte in den Blättern im Dauerweißlicht (DLw) in Kombination mit UV-B unterschiedlicher Bestrahlungsstärke.
Werte in mg/cm² Blattfläche, Mittelwerte aus 5 Versuchen unter Angabe der Standardabweichungen.

Belichtungsdauer (h)	24	48	72	96	120	168	216
DLw	0,277 [±] 0,023*	0,250 [±] 0,033	0,198 [±] 0,016	0,252 [±] 0,062	0,223 [±] 0,042	0,261 [±] 0,037	0,248 [±] 0,035
+ 100 mW/m ² UV-B	0,259 [±] 0,043	0,235 [±] 0,046	0,237 [±] 0,037	0,234 [±] 0,032	0,242 [±] 0,043	0,235 [±] 0,042	0,270 [±] 0,0
+ 300 mW/m ² UV-B	0,261 [±] 0,029	0,248 [±] 0,018	0,268 [±] 0,038	0,269 [±] 0,051	0,255 [±] 0,058	0,237 [±] 0,046	0,270 [±] 0,004
+ 1000 mW/m ² UV-B	0,216 [±] 0,029	0,203 [±] 0,051	0,209 [±] 0,06	0,223 [±] 0,05	0,196 [±] 0,035	0,211 [±] 0,039	0,268 [±] 0,014
KT _w -Kontrolle	0,253 [±] 0,028						0,286

* Standardabweichung

IV. 5. Einfluß auf den RNA-Gehalt der Blätter

Es liegen eine Vielzahl von Untersuchungen über den schädigenden Einfluß von UV-Strahlung auf Nukleinsäuren vor. Fast alle jedoch wurden an bakteriellen oder viralen Systemen durchgeführt, die UV-C-Strahlung exponiert wurden, meist begrenzt auf monochromatische Strahlung von 254 nm. Die verfügbaren Daten konzentrieren sich überdies auf photochemische Reaktionen der DNA und dem damit verbundenen Verlust an biologischer Aktivität. Den Stand der Kenntnisse über die UV-Wirkung auf RNA faßt CALDWELL (1981) in einem einzigen Satz zusammen: UV-Strahlung wird auch von RNA wirksam absorbiert, jedoch müssen viel höhere Strahlungsdosen absorbiert werden (verglichen mit DNA), bevor eine Inaktivierung eintritt.

Schon aufgrund des engen Zusammenhangs des RNA-Stoffwechsels mit der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung ist nicht auszuschließen, daß die Ursache der gefundenen UV-B-bedingten Schädigung des Induktionsmechanismus auf dem Niveau der RNA zu finden sein könnte. Zur Untersuchung dieser Fragen wurden Versuchspflanzen während 3 Kurztagen (10 h) zusätzlichem UV-B einer Bestrahlungsstärke von ca. 2 W/m^2 ausgesetzt. Einer weiteren Versuchsgruppe wurde die UV-B-Strahlung während der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung durch 3 Dauerlichttage verabreicht, wobei jedoch die UV-B-Quelle nur in Kurztag-Intervallen zugeschaltet wurde, um vergleichbare UV-B-Strahlungsmengen zu gewährleisten. Beiden Versuchsgruppen wurden jeweils Kontrollgruppen ohne UV-B-Bestrahlung gegenübergestellt. Zur Überprüfung der photoperiodischen Wirksamkeit der applizierten Strahlung wurden stets auch Kontrollpflanzen in den Gewächshaus-Kurztag zurückgebracht, um nach 6 Wochen auf Blütenanlagen hin untersucht zu werden (Tab.14).

Tab.14: Einfluß von UV-B-Strahlung auf die Blatt-RNA im Zusammenhang mit der Induktion der Blütenbildung.
Zusätzliches UV-B (ca. 2 W/m²) wurde während 3 Kurztagen (3 KT + UV) bzw. in 10 h-Intervallen während 72 h Dauer-Weißlicht (3 DL + UV) gegeben. Mittelwerte aus 7 Versuchen unter Angabe der Standardabweichungen.

Belichtung	KT	KT + UV	3 DL	3 DL + UV
Blütrate (%)	0	0	90	38
Gesamt-RNA (µg/g FG)	792 ± 74	711 ± 71	1058 ± 142	946 ± 62
Poly(A)-RNA (µg/g FG)	4,6 ± 0,7	3,7 ± 0,5	4,4 ± 0,8	4,4 ± 0,6
Translations- aktivität (kBq/µg Poly(A)- RNA)	40,2 ± 6,6	49,2 ± 6,3	69,6 ± 8,2	51,6 ± 9,6

IV. 5.2. Gesamt-RNA

Aus Blattmaterial von je 5 g Frischgewicht wurde die Gesamt-RNA extrahiert, wie unter II.2.2. beschrieben. Die quantitative Bestimmung mittels Absorptionsmessung bei 260 nm ergab folgendes Bild (Abb.15) :

Während unter induktivem Dauer-Weißlicht der RNA-Gehalt etwas erhöht ist (siehe auch III. 2.2.3.1.), verursachte die zusätzliche UV-B-Strahlung keinen statistisch signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Kontrollgruppen.

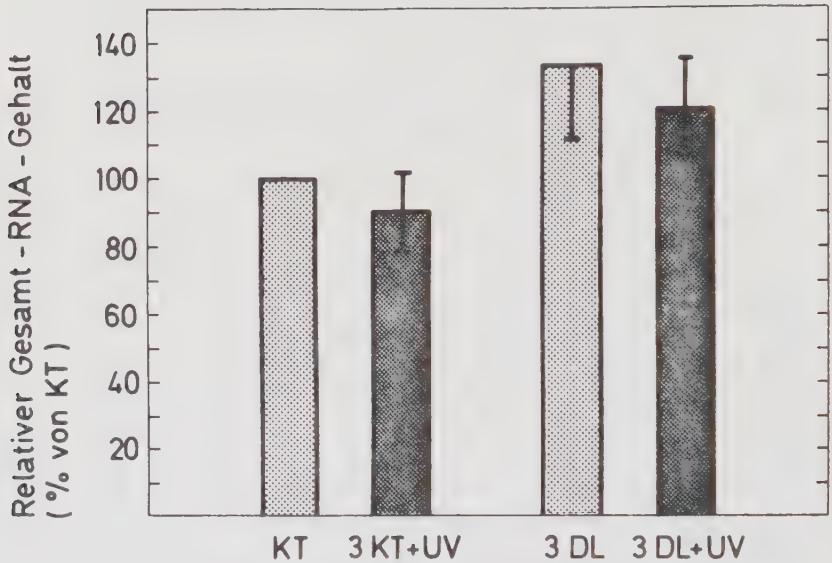


Abb.15.:

Gesamt-RNA-Gehalt der Blätter unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen, relativiert auf die Kurztag-Kontrolle (KT). Zusätzliches UV-B (ca. 2 W/m²) wurde während 3 Kurztagen (3 KT+UV) bzw. in 10 h-Intervallen während 72 h Dauerlicht (3 DL+UV) gegeben. Standardabweichungen sind eingezeichnet.

IV. 5.2. Poly(A)-RNA

Die mittels Adsorptionschromatographie (siehe II.2.3.) aus der Gesamt-RNA gewonnene Poly(A)-haltige RNA-Fraktion wurde ebenfalls photometrisch gemessen. Im Gegensatz zur Gesamt-RNA ergab sich hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen der Kurztag- und Dauer-Weißlicht-Gruppe. Unter Kurztagbedingungen verursachte aber eine zusätzliche UV-B-Bestrahlung eine Abnahme des Poly(A)-RNA-Gehalts um 20 %. Wurde dieselbe UV-B-Strahlungsmenge unter Dauerlichtbedingungen

gegeben, ist eine solche Abnahme nicht erkennbar (Abb. 16). Die Absolutwerte der RNA-Bestimmungen sind in Tab. 14 zusammengestellt.

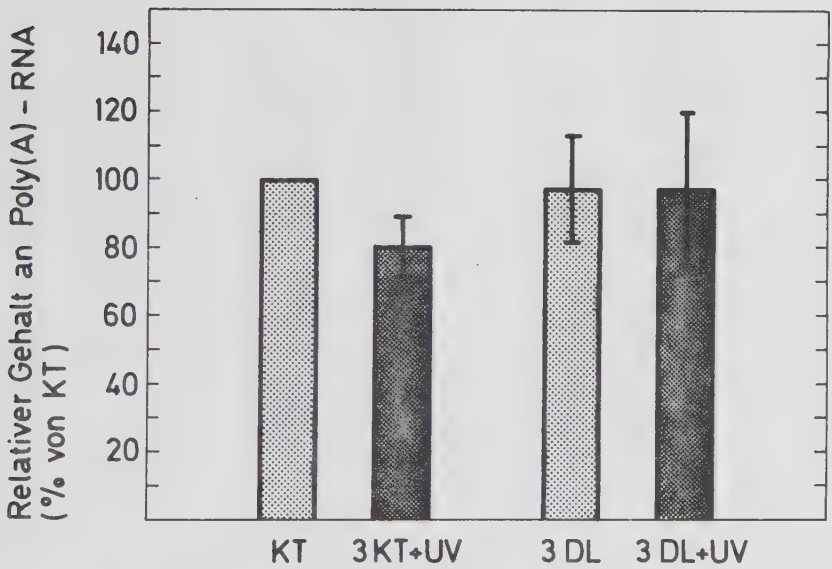


Abb.16:

Gehalt an Poly(A)-RNA, relativiert auf die Kurztag-Kontrolle (KT)
Bedingungen und Symbole siehe Abb. 15

IV. 5.3. Translationsaktivität

Um einen möglichen Einfluß von UV-B-Strahlung auf die Matrizenaktivität der Poly(A)-RNA in der Proteinbiosynthese feststellen zu können, wurden Aliquots der isolierten Poly(A)-RNA einem Kaninchen-Reticulocytenlysatz zugesetzt und darin *in vitro* translatiert (siehe II.2.4.). Die Translationsaktivität wurde bestimmt als Einbau von ^{35}S -Methionin in TCA-fällbares Material (Tab.14). Auf die Aktivität der KT-Kontrollen relativierte Werte sind in Abb. 17 dargestellt.

Ein deutlicher Anstieg der Translationsaktivität ist während der photoperiodisch wirksamen Dauerbelichtung zu verzeichnen (siehe auch II.2.2.3.3.). Zusätzliches UV-B hat im Kurztag und im Dauerlicht unterschiedliche Auswirkungen: während im Kurztag die Translationsaktivität dadurch leicht gesteigert wird, wird der Dauerlichtbedingte Anstieg deutlich gehemmt. Dennoch bleibt auch hier die Aktivität der Poly(A)-RNA über der Kurztag-Kontrollen. Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, daß UV-B auch auf der RNA-Ebene nicht nur schädigende, sondern auch fördernde Auswirkungen hat. Möglicherweise beruht ein solcher positiver Effekt auf der Aktivierung spezieller "repair"-Mechanismen.

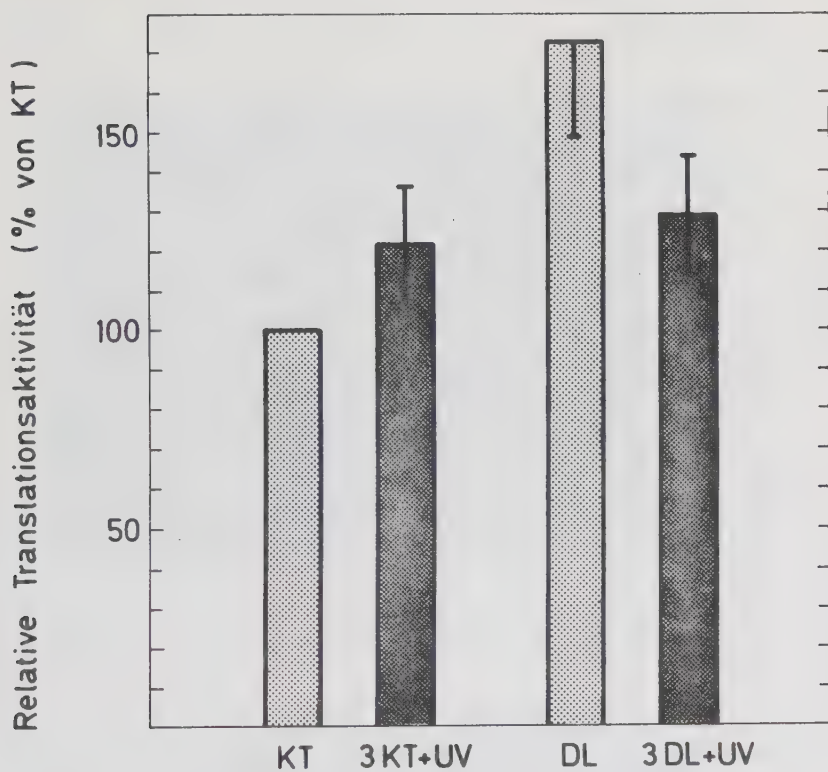


Abb. 17:

Translationsaktivität der Poly(A)-RNA im in vitro-System.
Bedingungen und Symbole siehe Abb.15.

IV. 6. Veränderungen in der Zusammensetzung der in vitro-Translationsprodukte

Um zu prüfen, ob UV-B-bedingte Veränderungen auf dem Translationsniveau gleichmäßig alle mRNAs bzw. Proteine betreffen oder ob UV-B bei der verwendeten Strahlungsmenge selektiv bestimmte RNA/Protein-Systeme beeinflusst, wurden die in vitro synthetisierten Translationsprodukte zweidimensional elektrophoretisch aufgetrennt (Methoden beschrieben unter II.2.5., siehe auch III.2.2.4.).

Eine Proteinmenge, die 8,3 kBq eingebautes ^{35}S -Methionin enthielt, war - wie auch bei den in Abschnitt III beschriebenen Versuchen - ausreichend, um nach Verstärkung durch einen in das Acrylamidgel eingelagerten Scintillator zu einer hinreichenden Schwärzung des Röntgenfilms zu führen. Eine Überladung des Trenngels war bei dieser Proteinmenge noch nicht zu beobachten. Abb. 18 a-d zeigen beispielhaft eine Gegenüberstellung solcher Auftrennungen: Translationsprodukte von mRNA aus KT-Kontrollpflanzen und photoperiodisch induzierten Pflanzen werden jeweils verglichen mit solchen aus zusätzlich UV-B-bestrahlten Pflanzen.

Die den Pflanzen verabreichte UV-B-Strahlung von ca. 2 W/m^2 führte zu keiner signifikanten Reduktion in der Vielzahl verschiedener Translationsprodukte. Vielmehr veränderten sich nur einige wenige spezifische Proteine durch die UV-Bestrahlung. Zwecks besserer Übersichtlichkeit sind diese in Abb. 19 aus den Photographien der Fluorogramme herausgezeichnet. Dabei wird deutlich, daß UV-B der verwendeten Bestrahlungsstärke - unabhängig von der Tageslänge und daher von den

Abb.18: Fluorographien elektrophoretisch aufgetrennter Translationsprodukte von mRNA aus Blättern nach Belichtung der Pflanzen mit und ohne zusätzlichem UV-B (ca. 2 W/m^2). UV-B wurde unabhängig von der Weißlichtdauer nur 10 h pro Tag zugeschaltet.

pH 4

← IEF

pH 7 KD

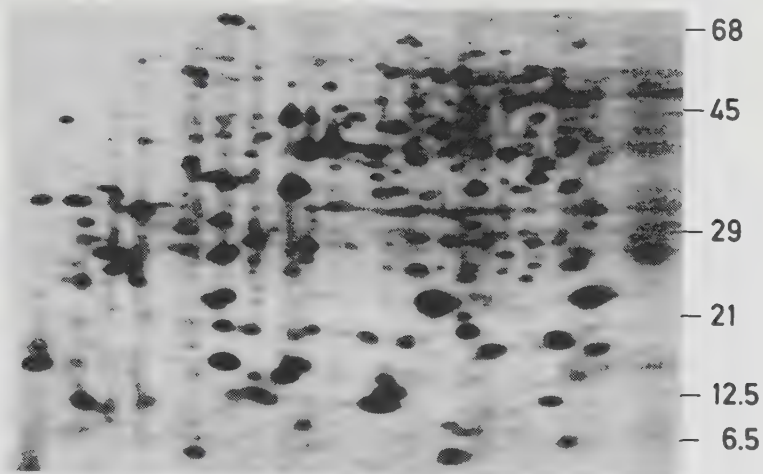


Abb.18a:
Kurzttag

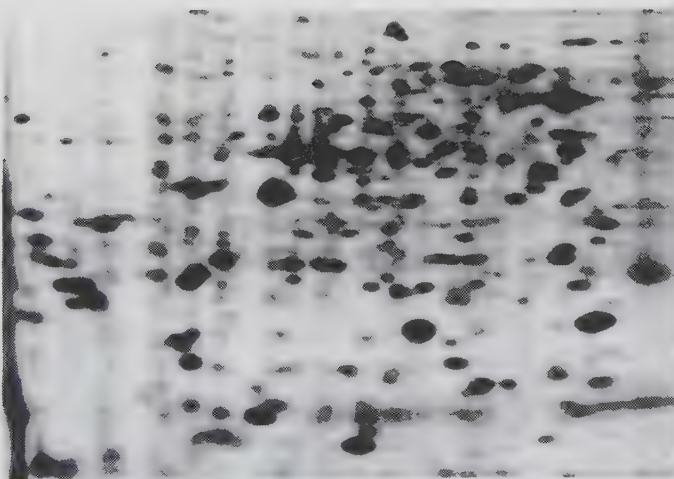


Abb.18b:
Kurzttag + UV-B

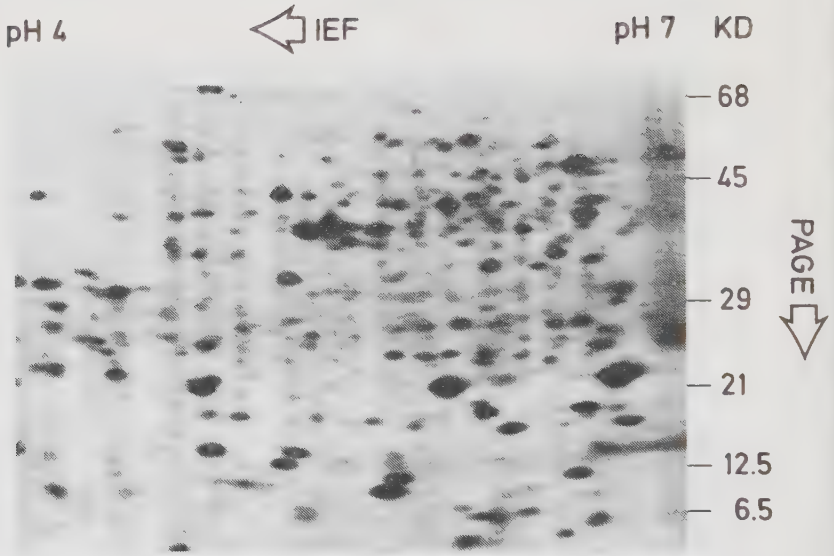


Abb.18c:
3 Dauerlichttage

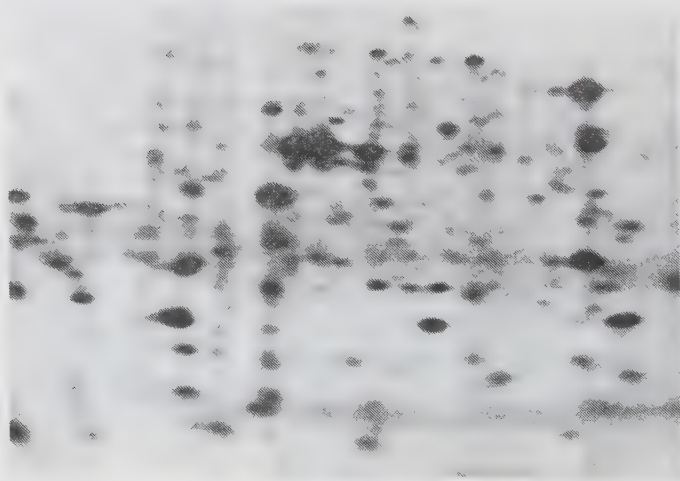


Abb.18d:
3 Dauerlichttage + UV-B

lichtinduzierten Veränderungen - nur auf sehr wenige spezifische RNA/ Protein-Systeme eine eindeutig destruktive Wirkung hat. Dagegen treten zwei Polypeptide (Molekulargewicht ca. 28 kD) nach UV-Bestrahlung neu oder deutlich verstärkt auf. Dies legt erneut die Vermutung nahe, daß durch die UV-Bestrahlung spezifische "repair"- oder Schutzmechanismen induziert werden könnten. Die in der Abbildung durch quadratische Symbole gekennzeichneten "spots" repräsentieren Proteine, die unter normalen Bedingungen im Zusammenhang mit der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung neu auftreten, nicht jedoch mit zusätzlicher UV-B-Bestrahlung. Möglicherweise könnte darin die Ursache für die Hemmung der Blühinduktion durch UV-B zu suchen sein (siehe IV.2.2.).

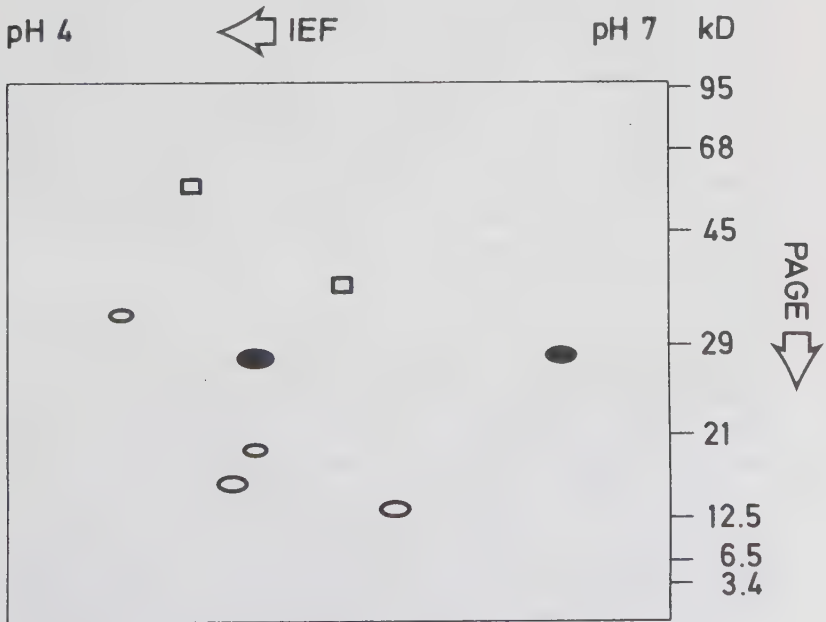


Abb.19:

Veränderungen der Translationsprodukte unter zusätzlicher UV-B-Bestrahlung. (Die "spots" wurden aus den Fluorogrammen von Abb.18 herausgezeichnet.)

- o = deutliche **Abnahme** durch UV-B
- = deutliche **Zunahme** durch UV-B
- = tritt im Zusammenhang mit Blühinduktion im Dauerweißlicht neu auf, nicht jedoch mit zusätzlichem UV-B.

IV. 7. Diskussion

Unter der Voraussetzung, daß die stratosphärische Ozonschicht durch die emissionsbedingte Schadstoffbelastung der Atmosphäre abnehmen wird, werden Organismen auf der Erdoberfläche einer erhöhten UV-Strahlenbelastung ausgesetzt sein. Angaben über die unter den derzeitigen atmosphärischen Bedingungen auf Pflanzen auftreffende UV-B-Strahlungsmenge gestalten sich aufgrund der vielfältigen Abhängigkeiten äußerst schwierig. Zu berücksichtigende Parameter sind Sonnenstand, Höhe über Meeresniveau, Bewölkung, Reflexion durch den Untergrund, natürlicher Ozongradient über die Breitengrade hinweg und nicht zuletzt die gegenseitige Beschattung einzelner Pflanzenteile bzw. deren Orientierung zum Lichteinfall. Die Angabe eines globalen jährlichen Durchschnittswerts der UV-B-Strahlungsstärke von 5 W m^{-2} (SCHULZE, 1977) kann daher nur ein grober Anhaltspunkt sein. Die an einem bestimmten Ort zu einer bestimmten Zeit tatsächlich auftretende Strahlung kann davon um einige Größenordnungen abweichen. So wurde z.B. für einen bewölkten Sommertag in Karlsruhe ein Tagesmittel von ca. 240 mW m^{-2} ermittelt (TEVINI und IWANZIK, 1982), für die Mittagszeit an einem Sommertag in Washington $2,7 \text{ W m}^{-2}$ (BARKER, 1968).

Obwohl auch Methoden zur genauen Berechnung der solaren UV-B-Strahlung in Abhängigkeit von allen oben genannten Faktoren zur Verfügung stehen (GREEN et al., 1980), lassen sich aufgrund der enormen natürlichen Schwankungsbreite die in den Versuchen verwendeten UV-B-Bestrahlungsstärken nur schwer mit globalen Freilandverhältnissen vergleichen (etwa in dem Sinn, man habe den Pflanzen das X-fache der heute natürlichen UV-B-Strahlung appliziert), zumal UV-B über den Untersuchungszeitraum jeweils mit konstanter Stärke gegeben und keine Simulation des Tagesganges vorgenommen wurde. Trotz dieser Einschränkungen kann aber gesagt werden, daß die in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten Bestrahlungsstärken im Rahmen dessen liegen, was auf Pflanzen unter natürlichen Bedingungen auftreten kann.

Die Untersuchungsergebnisse erlauben vielmehr eine Aussage über die Wirkungen von UV-B-Strahlung überhaupt. Da die Versuchspflanzen im Gewächshaus angezogen wurden, dessen Verglasung UV-B-undurchlässig ist, bedeutete die Bestrahlung während der Versuche für diese Pflanzen in jedem Fall eine UV-B-Belastung, an die sie nicht adaptiert waren. Das aus dem Nutzpflanzenbau bekannte Phänomen des Auspflanzungschocks zeigt, daß auch UV-B-Strahlung einer in unseren Breiten normalen Größenordnung an nicht-adaptierten Pflanzen schwere Schäden hervorrufen kann. BOGENRIEDER und KLEIN (1977) zeigten, daß eine UV-Adaptationsphase diesen "Schock" deutlich mindern kann. Unter erhöhter UV-B-Bestrahlung sind bei verschiedenen Nutzpflanzen-Keimlingen regelmäßig Schadwirkungen wie z.B. Verminderung des Blattflächenwachstums oder Abnahme des Frischgewichts festgestellt worden, unabhängig davon, ob die UV-B-Bestrahlung in Gewächshäusern, in Pflanzenwuchsschränken oder im Freiland mit Zusatzbestrahlung erfolgte (Lit. bei IWANZIK, 1983). Weniger der Absolutwert, als vielmehr eine **Erhöhung** der UV-B-Strahlungsstärke auf Werte, an die die Pflanze nicht adaptiert ist, scheint also für die beobachteten Wirkungen ausschlaggebend zu sein.

Über eine spezifische Wirkung von UV-B-Strahlung auf die Blütenbildung ist aus der Literatur nichts bekannt. Bei den wenigen diesbezüglichen Untersuchungen wurden Strahlungsquellen verwendet, die auch noch im kürzerwelligen Bereich emittieren. Schon HICKS (1932) konnte bei Lemnaceen durch Bestrahlung mit einer Quecksilberdampfampe (254 nm !) Blütenbildung auslösen, v.DENFFER und SCHLITT (1951) erzielten durch tägliche UV-Bestrahlung bei *Statice* und *Linum* eine Vorverlegung des Blühzeitpunkts. Durch die bekannt hohe Schadwirkung von UV-C-Strahlung auf lebende Systeme ist in diesen Fällen wohl eine sog. "Streßblüte" nicht auszuschließen. Dieser Wellenlängenbereich wird jedoch auch in Zukunft ökologisch nicht relevant sein.

Die vorliegenden Untersuchungen zur Wirkung von UV-B-Strahlung auf die Blütenbildung bei *Hyoscyamus* zeigen, daß dieser in der pflanzlichen Entwicklung so entscheidende Vorgang erheblich beeinflusst werden kann.

UV-B-Strahlung hemmt bzw. verzögert die photoperiodische Induktion der Blütenbildung, die Pflanzen verlieren an photoperiodischer Sensitivität. Dieser Effekt zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der UV-B-Bestrahlungsstärke.

Als eine weitreichende Folge, die eine globale oder regionale Zunahme der auf die Erdoberfläche auftreffenden UV-B-Strahlung haben könnte, sind deshalb auch ökologische Auswirkungen zu diskutieren. Da ein photoperiodisch gesteuerter Übergang zur Fortpflanzungsphase durch evolutive Mechanismen auf den für die Pflanzenart optimalen Zeitpunkt in der Vegetationsperiode fällt, würde eine Störung der bewährten photoperiodischen Reaktion der Pflanze mit hoher Wahrscheinlichkeit eine gravierende ökologische Benachteiligung mit sich bringen, möglicherweise sogar das Überleben der Art gefährden.

So konnten z.B. FOX und CALDWELL (1978) in Freilandversuchen mit zusätzlicher UV-B-Bestrahlung in verschiedenen Pflanzenpopulationen deutliche Auswirkungen auf das kompetitive Gleichgewicht zwischen den einzelnen Pflanzenarten nachweisen. Obwohl dies sicher in erster Linie auf die sehr unterschiedliche allgemeine UV-Sensitivität verschiedener Pflanzenspezies zurückzuführen ist, demonstriert es doch sehr augenfällig die hohe Störanfälligkeit von Pflanzengesellschaften durch eine Änderung des Umweltfaktors UV-B-Strahlung.

Die Untersuchungen des Pigment- und Proteingehalts in dieser Arbeit zeigen, daß Störungen ökologisch wichtiger Anpassungen wie der photoperiodischen Regulation der Blütenbildung durchaus nicht Strahlungsstärken voraussetzen, durch die eine allgemeine Schädigung der Pflanzen verursacht wird. Dieselben UV-B-Bestrahlungsstärken, die bei *Hyoscyamus* zu einer gravierenden Hemmung der Blütenbildung führten, bewirkten weder im Proteingehalt noch im Chlorophyll- oder Carotinoidgehalt der Blätter eine meßbare Abnahme. Dies spricht dafür, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen weder die photosynthetische Leistungsfähigkeit noch die Biosynthesekapazität der Pflanzen eingeschränkt ist.

Bezüglich des Proteingehalts UV-B-bestrahlter Pflanzen liegen in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben vor. Während IWANZIK (1983) in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit bei Radieschenkeimlingen keine signifikante Veränderung des Proteingehalts feststellte, wird in anderen Untersuchungen von einer Abnahme des Gehalts an Proteinen nach UV-B-Bestrahlung berichtet (BASIOUNY et al., 1978; VU et al., 1982). TEVINI et al. (1981) hingegen fanden in verschiedenen mono- und dikotylen Pflanzenarten erhöhte Proteingehalte. DUMPERT und KNACKER (1985) setzten 21 handelsübliche Sorten von 7 verschiedenen Getreide- und Gemüsearten erhöhter UV-B-Belastung aus und fanden gleichbleibende ebenso wie zu- und abnehmende Proteingehalte, ein Ergebnis, das die großen Unterschiede in der UV-Empfindlichkeit selbst innerhalb einer bestimmten Pflanzenart deutlich macht.

Wenn sich Hyoscyamus bezüglich einer allgemeinen Zellschädigung als relativ UV-unempfindlich erweist, mag dies unter anderem daran liegen, daß diese Pflanzenart in ihrer hohen Flavonoidsynthesekapazität über einen möglichen Schutzmechanismus gegen UV-B-Strahlung verfügt. Verstärkte Pigmentbildung ist eine bekannte Streßreaktion, die bei einer allgemeinen Schädigung der Pflanzen häufig auftritt. In einigen Fällen wurde jedoch eine Flavonoidinduktion durch niedrige UV-B-Intensitäten beobachtet, wobei das Wirkungsmaximum bei 290-300 nm lag und keinerlei negative Begleiterscheinungen auftraten. Eine Schutzfunktion dieser neu gebildeten Flavonoide gegen UV-B-Schädigung konnte mindestens in einem Fall unmittelbar nachgewiesen werden (Lit. siehe WELLMANN, 1983). Bei Hyoscyamus ist die Erhöhung des Flavonoidgehalts direkt abhängig von der UV-B-Strahlungsmenge. Bei einer Bestrahlung der Pflanzen mit 1000 mW m^{-2} UV-B wurden jedoch die höchsten gemessenen Flavonoidkonzentrationen bereits nicht mehr erreicht. Dies deutet darauf hin, daß bei einer so starken Erhöhung der UV-B-Belastung dieser angenommenen Schutzreaktion durch eine Schädigung der Biosynthesekapazität Grenzen gesetzt sind. Nach WELLMANN (mündliche Mitteilung) ist nicht damit zu rechnen, daß einmal gebildete Flavonoide durch Absorption von

UV-B-Strahlung in den verwendeten Größenordnungen wieder zerstört werden.

Ein weiteres Argument, das bei *Hyoscyamus* für die Annahme einer Schutzfunktion der Flavonoide gegen UV-B-Strahlung spricht, ist neben der linearen Dosis-Effekt-Beziehung die schnelle Reaktion der Pflanze auf die UV-Bestrahlung. Ein deutlicher Anstieg des Flavonoidgehalts tritt bereits wenige Stunden nach Einsetzen der Strahlenbelastung auf.

Die Anreicherung wasserlöslicher Pigmente wie der Flavonoide und Anthocyane erfolgt in den äußeren Zellschichten der Blätter (hauptsächlich in der Epidermis), ein weiterer Punkt, der für eine Rolle als Schutzpigmente spricht. Dieser Schutz kann zum einen durch die Erhöhung der Strahlungsreflexion an der Epidermis (ROBBERECHT und CALDWELL, 1978), aber auch durch eine direkte Absorption der schädlichen kurzwelligigen Strahlungsanteile gegeben sein. Die (gelben) Flavonoide weisen im UV-B-Bereich eine hohe Absorption auf (HARBORNE, 1965), so daß diese Komponenten als Schirmpigmente gegen UV-B-Strahlung dienen könnten. Dagegen ist eine solch direkte Funktion der Anthocyane als Schutzpigmente wegen der fehlenden Absorption im UV-Bereich unwahrscheinlich. Tatsächlich wird bei *Hyoscyamus* die Anthocyan-synthese durch UV-B-Bestrahlung nicht beeinflußt.

In ihrem Einfluß auf den RNA-Metabolismus und die Proteinbiosynthese zeigt UV-B-Strahlung ausgesprochen ambivalente Wirkungen.

Während der Gehalt an Poly(A)-RNA der Blätter im Kurztag durch UV-B-Bestrahlung leicht reduziert wird, nimmt deren Translationsaktivität im *in vitro*-System unter denselben Bedingungen deutlich zu. Die im Zusammenhang mit der Induktion der Blütenbildung auftretende drastische Erhöhung der Matrizenaktivität der Poly(A)-RNA bei der Proteinbiosynthese wird durch zusätzliches UV-B dagegen unterdrückt.

Beim Vergleich der Translationsprodukte, die ja die mRNA-Population der Zelle zum Untersuchungszeitpunkt widerspiegeln, wurde deutlich, daß - unabhängig von der Dauer der Weißlichtbestrahlung - einzelne mRNA-Spezies sehr selektiv durch UV-B-Strahlung beeinflußt werden. Einige wenige werden durch UV-B auffallend reduziert, wogegen mindestens zwei andere neu oder deutlich verstärkt auftreten.

Daraus kann geschlossen werden, daß UV-B-Strahlung nicht ausschließlich destruktive, sondern auch synthesesfördernde Wirkungen auf den Nukleinsäure-Stoffwechsel haben kann.

Neu bzw. vermehrt auftretende mRNAs könnten unter anderem mit der Induktion der Flavonoidsynthese in Zusammenhang stehen. Es ist bekannt, daß die gesamte Enzymsequenz, die an der Flavonoidbiosynthese beteiligt ist, durch UV-B induziert wird (HAHLBROCK et al., 1976) und daß diese Enzyminduktion durch eine de novo-Synthese erfolgt (HAHLBROCK und GRISEBACH, 1979). Ebenso konnte nachgewiesen werden, daß die Regulation dieser Induktion auf einer Stufe vor der mRNA-Aktivität stattfindet (GARDINER et al., 1980).

Zwei Proteine, die im Zusammenhang mit der Induktion der Blütenbildung neu auftreten, konnten in Proben aus zusätzlich UV-B-bestrahlten Pflanzen nicht festgestellt werden. Möglicherweise liegt hierin der Schlüssel zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen der UV-B-Wirkung und der Blühinduktion. Inwieweit darin aber die unmittelbare Ursache zu suchen ist für die Hemmung der photoperiodischen Induktion durch UV-B, kann aufgrund der vorliegenden Befunde noch nicht schlüssig beurteilt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen aber eindeutig, daß ein für den Fortbestand der Pflanzenart so entscheidender Prozeß wie die photoperiodisch gesteuerte Blütenbildung durch solche Bestrahlungsstärken von UV-B drastisch gehemmt wird, die keine äußerlich sichtbaren Schädigungen an der Pflanze hervorrufen und die darüber hinaus

auch intrazelluläre Parameter wie z.B. Proteingehalt, Chlorophyll- und Carotinoidgehalt nicht beeinflussen. Daraus kann bei aller Vorsicht der Interpretation und ohne dieses Ergebnis verallgemeinern zu wollen geschlossen werden, daß spezifische Entwicklungsvorgänge gegen UV-B-Bestrahlung empfindlicher als bisher erwartet sind.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung wird nach verschiedenen Hypothesen in den Blättern ein "Blühhormon" (Florigen) gebildet oder aber die Synthese eines spezifischen "Blühhemmstoffs" verhindert. Dies führt zu einer Umsteuerung des Apikalmeristems von der Produktion vegetativer Organe zur Ausbildung von Blütenanlagen. Die qualitative Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* ist, bedingt durch ihre rosettige Wuchsform, zur selektiven Untersuchung der Vorgänge im Blatt besonders geeignet. Schon eine kontinuierliche Weißlichtbestrahlung von 72 Stunden ist für eine vollständige Induktion ausreichend. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zur Aufklärung der bei der Blühinduktion im Blatt ablaufenden Prozesse beizutragen.
2. Entblättert man *Hyoscyamus*-Pflanzen bis auf die Rübe, so bilden sie innerhalb weniger Wochen Blütenanlagen aus, wobei sie keine photoperiodische Abhängigkeit mehr zeigen. In den hier vorgelegten Versuchsergebnissen fanden bisher umstrittene Versuche von LANG und MELCHERS (1943) ihre Bestätigung. Dieser Befund wird als starkes Indiz für die Existenz eines "Blühhemmstoffs" gewertet, der von den Blättern zum Apikalmeristem exportiert wird und dort die Aufrechterhaltung des vegetativen Zustands bewirkt.

3. In den letzten Jahren ist bei Untersuchungen zum Mechanismus der Immunisierung des Nukleinsäure-System der Pflanze mehr und mehr in den Vordergrund getreten. Hyoscyamus kann durch Infektionen der Samenansätze z. B. durch *2-TU*, in die Blätter und unter günstig Bedingungen zum Blühen gebracht werden, eine Krankheit, die innerhalb von 3 Tagen durch nachfolgende Überimpfung reversierbar ist. In dieser Arbeit sollte der Einfluß von *2-TU* auf die Blatt-*mRNA*, insbesondere auf die *rib-mRNA*, untersucht werden.
4. *2-TU* wurden wie *1-TU* und als Vergleichssubstanz das bezugslos konzentrierte und reine *1-TU* (reines *1-TU*) wurden jeweils mit 10^{-3} M Lösung mittels Vakuuminfiltration in die Blätter eingebracht. Die nach 72 Stunden aus Blattgewebe extrahierte Gesamt-*mRNA* zeigte eine geringe aber charakteristische Abnahme durch die Benetzungslage. Bezugslos blieb die *Poly(A)*, *mRNA* in diesem Zeitraum unverändert. Die Translationsaktivität der *Poly(A)*-*mRNA* wurde in einem *in vitro*-Translationssystem (*Carotien-Pan-Drizy-System*) anhand des Ribosom von *E. coli* (Mitsunuma & Mitsunuma) (Mitsunuma & Mitsunuma) gemessen. Wie bei *2-TU*-Behandlung vorübergehend deutlich erhöht, ein Effekt, der mit *1-TU* nicht auftritt.
5. Wie *in vitro* gebildeten Polypeptide wurden mittels hochauflösender Polyacrylamid-Gelelektrophorese voneinander aufgetrennt. Fluoreszenzanalysen dieser Auftrennungen machten deutlich, daß *2-TU* in der verwendeten Konzentration nicht zu einer allgemeinen Hemmung der Proteinbiosynthese führt. Vielmehr treten nach *2-TU*-Behandlung neue, bisher noch unbekannte, auf, während andere abnehmen werden. Leuchtanalysen und Messungen der Fluoreszenz ergaben, daß diese *2-TU*-induzierten Veränderungen der *mRNA* nach 72 Stunden wieder auf den Ausgangszustand wieder um auf die Ausgangszustand zurückzuführen.

6. Aus den vorliegenden Ergebnissen wird geschlossen, daß die Regulation der Blütenbildung in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Nukleinsäure-Stoffwechsel steht und auch auf der Ebene des Blattes via differentieller Genexpression verlaufen könnte, wie es bislang nur für die Vorgänge am Apikalmeristem angenommen wurde. Eine kombinierte Blühormon-Blühhemmstoff-Hypothese wird diskutiert.
7. In weiteren Versuchen wurde die Wirkung von UV-B-Strahlung (280-320 nm) auf die photoperiodische Blühinduktion bei *Hyoscyamus niger* untersucht.

Solarstrahlung dieses Wellenlängenbereichs wird von der stratosphärischen Ozonschicht absorbiert und erreicht nicht die Erdoberfläche. Anthropogene Umwelteinflüsse scheinen jedoch zu einer Reduktion der Ozonschicht zu führen und damit auch zu einer Zunahme der UV-B-Strahlenbelastung für die Organismen auf der Erde.

8. UV-B-Strahlung hemmt bzw. verzögert die photoperiodische Induktion der Blütenbildung, d.h. die Pflanzen verlieren an photoperiodischer Sensitivität. Dieser Effekt zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der UV-B-Bestrahlungsstärke, die in den hier beschriebenen Versuchen mit $0,1-2,0 \text{ Wm}^{-2}$ stets im Rahmen dessen lag, was auf die Pflanzen unter natürlichen Bedingungen auftreten kann. Bei zunehmender UV-B-Strahlung muß folglich mit Störungen in ökologischen Systemen gerechnet werden, da sich eine Verschiebung des durch fortwährenden Selektionsdruck optimal angepaßten Blühzeitpunkts einzelner Pflanzenarten auf das kompetitive Gleichgewicht zwischen den Arten negativ auswirken wird.
9. Die angewandten UV-B-Bestrahlungsstärken führten weder zu äußerlich sichtbaren Schädigungen der Pflanzen, noch zu Abnahmen im Chlorophyll- oder Proteingehalt. Auch die Carotinoid- und Anthocyan synthese wird dadurch nicht beeinflusst. Dagegen verfügt *Hyoscyamus* mit einer

UV-induzierten Erhöhung der Flavonoidsynthese bis zu einem gewissen Grad über einen Schutzmechanismus gegen UV-B-Strahlung.

10. Untersuchungen des RNA-Metabolismus und der Protein-de novo-Synthese nach UV-B-Bestrahlung (2 Wm^{-2}) führten zu ambivalenten Ergebnissen: Während unter Kurztagbedingungen der Gehalt an Poly(A)-RNA in den Blättern reduziert wird, nimmt deren Translationsaktivität im in vitro-System deutlich zu. Dagegen wird die bei der Induktion der Blütenbildung durch Dauerweißlicht auftretende starke Erhöhung der Matrizenaktivität durch zusätzliches UV-B unterdrückt. Auftrennungen der Translationsprodukte durch zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese machten deutlich, daß UV-B-Strahlung sehr selektiv einzelne mRNA-Spezies beeinflusst. Unabhängig von der Tageslänge hat UV-B auf einige wenige RNA/Protein-Systeme eine deutlich destruktive Wirkung, während mindestens zwei Polypeptide nach UV-B-Bestrahlung regelmäßig neu auftreten. Dagegen wird das Auftreten zweier photoperiodisch induzierter Polypeptide durch UV-B unterdrückt.
11. Mögliche Zusammenhänge der beobachteten UV-B-Effekte auf den Zellstoffwechsel mit der Induktion der Blütenbildung sowie Hinweise auf ein UV-spezifisches "repair"-System werden diskutiert.

IV. LITERATURVERZEICHNIS

- Attmannspacher, W. (1981) Über Messungen des vertikalen Ozongehalts der freien Atmosphäre oberhalb 20 km Höhe über dem Hohenpeissenberg. In: Einflüsse von Umweltchemikalien auf das Klima und biologische Folgewirkungen. II. BPT-Bericht 2/81, pp. 77-88, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München.
- Aviv, H., P. Leder (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on Oligo-thymidylic acid-Cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412.
- Awad, M., R.E. Young (1979) Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase and pectinmethylesterase in Avocado (*Persea americana* Mill., cv. Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. Plant Physiol. 64, 306-308.
- Barker, R.E., Jr. (1968) The availability of solar radiation below 290 nm and its importance in photomodification of polymeres. Photochem. Photobiol. 7, 275-295.
- Basiouny, F.M., T.K. Van, R.H. Biggs (1978) Some morphological and biochemical characteristics of C₃ and C₄ plants irradiated with UV-B. Physiol. Plant. 42, 29-32.
- Benda, G.T.A. (1955) Some effects of ultraviolet radiation on leaves of French beans. Ann. Appl. Biol. 43, 71-85.
- Bernier, G. (1986) The flowering process as an example of plastic development. In: D.H. Jennings, A.J. Trewavas (eds.) Plasticity in plants, Company of Biologists Ltd., Cambridge, U.K., pp.257-286.

- Bernier, G., J.M. Kinet, R.M. Sachs (1981) The physiology of flowering, CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- Bogenrieder, A., R. Klein (1977) Die Rolle des UV-Lichtes beim sog. Auspflanzungsschock von Gewächshaussetzlingen. *Angew. Bot.* 51, 99-107.
- Bonner, W.M., R.A. Laskey (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamid gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83-88.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- Bridge, M.A., W.L. Klarmann (1973) Soybean phytoalexin, hydroxyphaseollin induced by ultraviolet radiation. *Phytopathology* 63, 603-609.
- Bünning, E. (1963) *Die physiologische Uhr*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Caldwell, M.M. (1968) Solar ultraviolet radiation as an ecological factor for alpine plants. *Ecological Monographs*, Durham, N.C., 38, 243-268.
- Caldwell, M.M. (1971) Solar UV radiation and the growth and development of higher plants. In: A.C. Giese (ed.), *Photophysiology* VI, 131-177.
- Caldwell, M.M. (1981) Plant response to solar ultraviolet radiation. In: O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler (eds.), *Physiological plant ecology I*, Encyclopedia of plant physiology, new series, Vol. 12 A, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 169-197.

- Chrispeels, M.J., J.E. Varner (1967) Gibberellic acid-enhanced synthesis and release of α -amylase and ribonuclease by isolated barley aleuron layers. *Plant Physiol.* 42, 398-406.
- Collins, W., F. Salisbury, C.W. Ross (1963) Growth regulators and flowering: Antimetabolites. *Planta* 60, 131-144.
- Denffer, D., von (1950) Blühormon oder Blühhemmung ? Neue Gesichtspunkte zur Physiologie der Blütenbildung. *Naturwiss.* 37, 297-301.
- Denffer, D., von, L. Schlitt (1951) Blühförderung durch Ultraviolettbestrahlung. *Naturw.* 38, 564-565.
- Duell-Pfaff, N., E. Wellmann (1982) Involvement of phytochrome and a blue light photoreceptor in UV-B induced flavonoid synthesis in parsley (*Petroselinum hortense* Hoffm.) cell suspension cultures. *Planta* 156, 213-217.
- Dumpert, K., T. Knacker (1985) A comparison of the effects of enhanced UV-B radiation on some crop plants exposed to greenhouse and field conditions. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 180, 599-612.
- Eichhoff, E. (1969) Untersuchungen zur Induktion der Blütenbildung bei der Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* im Kurztag durch 2-Thiouracil. Dissertation, Universität München.
- Eichhoff, E., W. Rau (1969) Auslösung der Blütenbildung bei der Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* im Kurztag durch 2-Thiouracil. *Planta* 87, 290-303.
- Esashi, Y. (1966) The relation between red and blue or far-red lights in the night interruption of the photoperiodic tuberisation in *Begonia evansiana*. *Plant and Cell Physiol.* 7, 405-414.

- Evans, L.T. (1964) Inflorescence initiation in *Lolium temulentum* L. VI. Effect of some inhibitors of nucleic acid, protein and steroid biosynthesis. *Aust. J. Biol. Sci.* 17, 24-35.
- Evans, L.T. (1971) Flower induction and the florigen concept. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22, 365-394.
- Fedorcsak, J., L. Ehrenberg (1966) Effects of diethylpyrocarbonate and methyl-methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem. Scand.* 20, 107.
- Feierabend, J., R. Bünsow (1967) Fördernder Einfluß von Chloramphenicol auf die Vernalisation von Winterroggen. *Flora Abt. A* 158, 153-156.
- Fox, F.M., M.M. Caldwell (1978) Competitive interaction in plant populations exposed to supplementary ultraviolet-B radiation. *Oecologia* 36, 173-190.
- Gardiner, S.E., J. Schröder, U. Matern, D. Hammer, K. Hahlbrock (1980) mRNA dependent regulation of UDP-apiose synthase activity in irradiated plant cells. *J. Biol. Chem.* 255, 10752-10757.
- Garner, W.W., H.A. Allard (1920) The effect of the relative length of the day and night and other factors of environment on growth and reproduction in plants. *J. Agr. Res.* 18, 552-607.
- Götz, F.W.P., P. Casparis (1943) Photographie des ultravioletten Sonnenspektralendes. *Chem. Zentralbl.*, 1644.
- Green, A.E.S., K.R. Cross, L.A. Smith (1980) Improved analytic characterization of ultraviolet skylight. *Photochem. Photobiol.* 31, 59-65.
- Grisebach, H., J. Ebel (1978) Phytoalexins, chemical defense substances of higher plants? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17, 635-647.

- Grobecker, A.J., S.C. Coroniti, R.H. Cannon (1974) The effects of stratospheric pollution by aircraft. Department of Transportation, Washington, Systems Development and Technology Dept., Rept. No. DOT-BT-75-50.
- Hahlbrock, K., H. Grisebach (1979) Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30, 105-130.
- Hahlbrock, K., K.H. Knobloch, F. Kreuzaler, J .R.M. Potts, E. Wellmann (1976) Coordinated induction and subsequent activity changes of two groups of metabolically interrelated enzymes. *Eur. J. Biochem.* 61, 199-206.
- Hall, T.C. (1979) Plant messenger RNA. In: J.W. Davies (ed.), *Nucleic Acids in Plants*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 217-251.
- Hall, T.C., B.U. Buchbinder, J .W. Pyne, S.M. Sun, F.A. Bliss (1978) Messenger RNA for G1 protein of French bean seeds: cell-free translation and product chracterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3196-3200.
- Harborne, G.B. (1965) *Flavonoid pigments*. Plant Biochemistry, London.
- Hartmann, K.U., C. Heidelberger (1961) Studies on fluorinated pyrimidines. XIII. Inhibition of thymidilate synthetase. *J. Biol. Chem.* 236, 3006-3013.
- Heslop-Harrison, J. (1960) Suppressive effects of 2-thiouracil on differentiation and flowering in *Cannabis sativa*. *Science* 132, 1943-1944.
- Hess, D. (1959) Die selektive Blockierung eines an der Blühinduktion beteiligten Ribosenucleinsäure-Eiweiß-Systems durch 2-Thiouracil (untersucht an *Streptocarpus wendlandii*). *Planta* 54, 74-94.

- Hicks, L.E. (1932) Flower production in the Lemnaceae. Ohio J. Sci. 32, 115-131.
- Hirono, Y., G.P. Rédei (1966) Early flowering in Arabidopsis induced by DNA-base analogues. Planta 71, 107-112.
- Iwanzik, W. (1983) Wirkung von UV-Strahlung auf das Wachstum von Keimlingen und die Zusammensetzung und photosynthetische Aktivität von Blättern und isolierten Chloroplasten. In: M. Tevini (ed.), Karlsruher Beiträge zur Entwicklungsphysiologie der Pflanzen.
- Jacqmard, A., D. Pierard, G. Bernier (1975) Specific proteins in the apical bud of Sinapis in transition to flowering. XII. Internat. Congr. Bot. Abst., Leningrad.
- Klautke, S., W. Rau (1973) Auslösung der Blütenbildung durch Cycloheximid im Kurztag bei der Langtagpflanze Hyoscyamus niger. Planta 112, 25-34.
- Kloppstech, K. (1985) Diurnal and circadian rhythmicity in the expression of light-induced plant nuclear messenger RNAs. Planta 165, 502-506.
- Knott, J.E. (1934) Effect of localized photoperiod on spinach. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 31, 152-154.
- Kriechbaum, D. (1986) Untersuchungen zur Beteiligung von Ethylen und Gibberellinen an pflanzlichen Entwicklungsprozessen. Dissertation, Universität München.
- Krinsky, N.J. (1979) Carotenoid protection against oxidation. Pure Appl. Chem. 51, 649-660.
- Lang, A. (1979) Inhibition of flowering in long-day plants. In: F. Skoog (ed.), Plant Growth Substances, Berlin.

- Lang, A., G. Melchers (1943) Die photoperiodische Reaktion von *Hyoscyamus niger*. *Planta* 33, 653-702.
- Langen, P. (1968) Antimetabolite des Nukleinsäure-Stoffwechsels. Akademie- Verlag, Berlin.
- Laulhere, J.-P., C. Rozier (1976) One-step extraction of plant nucleic acids. *Plant Sci. Letters* 6, 237-242.
- Lees, A.D. (1966) Photoperiodic timing mechanism. *Nature* 210, 986.
- Lindoo, S.J., M.M. Caldwell (1978) Ultraviolet-B radiation-induced inhibition of leaf expansion and promotion of anthocyanin production. *Plant Physiol.* 61, 278-282.
- Lockhart, J.A., U. Brodführer-Franzgrote (1961) The effects of ultraviolet radiation on plants. In: W. Ruhland (ed.), *Handbuch der Pflanzenphysiologie XVI*, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, pp. 532-554.
- Mancinelli, A.L., C.H. Yang, P. Lindquist, O.R. Anderson, J. Rabino (1975) Photocontrol of anthocyanin synthesis. III. The action of streptomycin on the synthesis of chlorophyll and anthocyanin. *Plant Physiol.* 55, 251-257.
- Maniatis, F., E.F. Fritsch, J. Sambrook (1982) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Lab.
- Mann, H.B., D.R. Whitney (1947) On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statist.* 18, 50-60.
- Mans, R.J., G.D. Novelli (1961) Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disc method. *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 48-53.

- Meijer, G. (1957) The influence of light quality on the flowering response of *Salvia occidentalis*. *Acta Bot. Nederl.* 6, 395-406.
- Melchers, G. A. Lang (1941) Weitere Untersuchungen zur Frage der Blüh-hormone. *Biol. Zbl.* 61, 16-39.
- Mohr, H., R. Senf (1966) Die Hemmung der phytochrominduzierten Anthocyansynthese durch Puromycin and 2-Thiouracil. *Planta* 71, 195-203.
- Molina, M.J., F.S. Rowland (1974) Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom - catalysed destruction of ozone. *Nature* 249, 810-812.
- Mood, A.M. (1954) On the asymptotic efficiency on certain nonparametric two-sample tests. *Ann. Math. Statist.* 25, 514-522.
- Mozer, T.J. (1980) Partial purification and chracterization of the mRNA for α -amylase from barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 65, 834-837.
- National Academy of Sciences (NAS) (1982) Causes and effects of stratospheric ozone reduction: An update. National Academy Press, Washington D.C., p. 339.
- Paetzold, H.K. (1973) The influence of solar activity on the stratospheric ozone layer. *Pure and Appl. Geophys.* 106-108, 1308-1311.
- Palatnik, C.M., R.V. Storti, A.K. Capone, A.Jacobson (1980) Messenger RNA stability in *Dictyostelium discoideum*: Does poly(A) have a regulatory role ? *J. Mol. Biol.* 141, 99-118.
- Parker, M.W., S.B.Hendricks, H.A. Borthwick, N.J. Sculli (1946) Action spectrum for the photoperiodic control of floral initiation of short-day plants. *Bot. Gaz.* 108, 1-26.

- Parker, M.W., S.B. Hendricks, H.A. Borthwick (1949) Action spectrum for the photoperiodic control of floral initiation of the long-day plant *Hyoscyamus niger*. Bot. Gaz. 111, 242-252.
- Pelham, H.R.B., R.J. Jackson (1976) An efficient mRNA dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur. J. Biochem. 67, 247-256.
- Pfliegler, A. (1975) Über den Einbau von 2-Thiouracil in die Ribonukleinsäuren im Zusammenhang mit der Blütenbildung bei *Hyoscyamus niger*. Zulassungsarbeit für das Lehramt an Höheren Schulen, Universität München.
- Rentschler, H.G. (1967) Photoperiodische Induktion der Monosporenbildung bei *Porphyra tenera* (Rhodophyta, Bangiophyceae). Planta 76, 65-74.
- Rhoads, R.E., G.S. McKnight, R.R. Schimke (1973) Quantitative measurement of ovalbumin messenger ribonucleic acid activity. J. Biol. Chem. 248, 2031-2039.
- Robberecht, R., M.M. Caldwell (1978) Leaf epidermal transmittance of ultraviolet radiation and implications for plant sensitivity to ultraviolet radiation induced injury. Oecologia 32, 277-287.
- Ross, C. (1970) Antimetabolite studies and the possible importance of leaf protein synthesis during induction of flowering in the cocklebur. In: G. Bernier (ed.), Cellular and molecular aspects of floral induction, Longman, London, p. 139.
- Schneider, M.J., W.R. Stimson (1972) Phytochrome and photosystem I interaction in a high-energy photoresponse. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2150 - 2154.
- Schrott, E.L., A. Huber-Willer, W. Rau (1981) Is phytochrome involved in the light-mediated carotenogenesis in *Fusarium aquaeductum* and *Neurospora crassa* ? Photochem. Photobiol. 35, 213-216.

- Schulze, R. (1977) Strahlenquellen der Biosphäre. In: J. Kiefer (ed.), Ultraviolette Strahlen, Walter de Gruyter, Berlin, pp. 17-46.
- Sebesta, K., J. Baueroва, Z. Sormova (1961) Inhibition of uracil and thymidin degradation by some 5-substituted uracil analogues. Biochim. Biophys. Acta 50, 393-394.
- Setlow, R.B. (1974) The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3363-3365.
- Sisson, W.B., M.M. Caldwell (1975) Lamp/filter systems for simulation of solar UV irradiance under reduced atmospheric ozone. Photochem. Photobiol. 21, 453-456.
- Sisson, W.B., M.M. Caldwell (1976) Photosynthesis, dark respiration and growth of *Rumex patientia* L. exposed to ultraviolet irradiance (288-325 nm) simulating a reduced atmospheric ozone column. Plant Physiol. 58, 563-568.
- Steinmüller, D. (1986) Zur Wirkung ultravioletter Strahlung (UV-B) auf die Struktur von Blattoberflächen und zu Wirkungsmechanismen bei der Akkumulation und Biosynthese der Kutikularlipide einiger Nutzpflanzen. In: M. Tevini (ed.), Karlsruher Beitr. Entw. Ökophysiologie. 6, 1-174.
- Stolwijk, J.A.J., J.A.D. Zeevart (1955) Wave length dependence of different light reactions governing flowering in *Hyoscyamus niger*. Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. 580, 386-396.
- Teltscherova, L. (1967) Effects of some pyrimidine analogues on flowering of long-day plants and short-day plants. Biol. Plant. 9, 234-243.

- Teramura, A.H., M.M. Caldwell (1981) Effects of ultraviolet-B irradiances on soybean. IV. Leaf ontogeny as a factor in evaluating ultraviolet-B irradiance effects on net photosynthesis. *Am. J. Bot.* 68, 934-941.
- Teramura, A.H., R.H. Biggs, S. Kossuth (1980) Effects of ultraviolet-B irradiances on soybean. II. Interaction between ultraviolet-B and photosynthetically active radiation on net photosynthesis, dark respiration and transpiration. *Plant Physiol.* 65, 483-488.
- Tevini, M., W. Iwanzik (1982) Untersuchungen über den Einfluß erhöhter UV-B-Bestrahlung auf Entwicklung, Zusammensetzung, Struktur und Funktion von Pflanzen. BPT-Bericht 1/82, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München.
- Tevini, M., W. Iwanzik, U. Thoma (1981) Some effects of enhanced UV-B radiation on the growth and composition of plants. *Planta* 153, 388-394.
- Tobin, A.J. (1979) Evaluating the contribution of post-transcriptional processing to differential gene expression. *Develop. Biol.* 68, 47-58.
- Tobin, E.M., A.O. Klein (1975) Isolation and translation of plant messenger RNA. *Plant Physiol.* 56, 88-92.
- Tupy, J. (1966) Synthesis of protein and RNA in pollen tubes stimulated with 2-thiouracil. *Biol. Plant.* 8, 398-410.
- Tupy, J., R.G. Stanley, H.F. Linskens (1965) Stimulation of pollen tube growth in vitro by thiouracil and other antimetabolites of nucleic acid bases. *Acta Bot. Nederl.* 14, 148-154.
- Vince-Prue, D. (1975) Photoperiodism in plants. McGraw-Hill, London.

- Vu, C.V., L.H. Allen, L.A. Garrard (1982) Effects of supplemental UV-B radiation on primary photosynthetic carboxylating enzymes and soluble proteins in leaves of C_3 and C_4 crop plants. *Physiol. Plant.* 55, 11-16.
- Warm, E. (1977) Untersuchungen zum Mechanismus der Blüteninduktion bei der Langtagpflanze *Hyoscyamus niger*. Dissertation, Universität München.
- Warm, E. (1984) Changes in the composition of in vitro translated leaf m-RNA caused by photoperiodic flower induction of *Hyoscyamus niger*. *Physiol. Plant.* 61, 344-350.
- Warm, E., W. Rau (1982) A quantitative and cumulative response to photoperiodic induction of *Hyoscyamus niger*, a qualitative long-day plant. *Z. Pflanzenphysiol.* 105, 111-118.
- Weber, E. (1980) *Grundriß der biologischen Statistik*. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Wellensiek, S.J. (1970) The floral hormones in *Silene armeria* and *Xanthium strumarium*. *Z. Pflanzenphysiol.* 63, 25-30.
- Wellmann, E. (1971) Phytochrome mediated flavone glycoside synthesis in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* after pre-irradiation with ultraviolet light. *Planta* 101, 283-286.
- Wellmann, E. (1983) UV radiation in photomorphogenesis. In: W. Shropshire, Jr., H. Mohr (eds.), *Encyclopedia of plant physiology* (new series) 16 B, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 745-756.
- Zeevaart, J. A.D. (1962) DNA-multiplication as a requirement for expression of the floral stimulus in *Pharbitis nil*. *Plant Physiol.* 37, 296-304.

Ziegler, R., K. Egle (1965) Zur quantitativen Analyse der Chloroplastenpigmente. I. Kritische Überprüfung der spektralphotometrischen Chlorophyll-Bestimmung. Beitr. Biol. Pfl. 41, 11-37.

Meinem Lehrer Herrn Prof. Dr. W. Rau möchte ich an dieser Stelle herzlich danken für seine unermüdliche Unterstützung in allen wissenschaftlichen und persönlichen Belangen und für die unzähligen wertvollen Ratschläge und Diskussionen.

Frau T. Kydd hat mich bei der Durchführung vieler Versuche tatkräftig unterstützt. Für ihre sorgfältige und zuverlässige Arbeit sei ihr in besonderem Maß gedankt.

Herrn P. Debbert, Frau M. Schwormstede sowie Frl. A. Hesse danke ich für die gewissenhafte Anzucht und Betreuung der Versuchspflanzen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. E. Warm, der während seiner Zeit am Botanischen Institut jederzeit für freundschaftliche Ratschläge zur Verfügung stand,

sowie allen Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Rau für die langjährige freundschaftliche und stets hilfsbereite Zusammenarbeit.

Und nicht zuletzt danke ich Frau A. Oettl für die Reinschrift, Frau J. Seifert für die Zeichnungen und Herrn K. Liedl für die Photographien dieses Manuskripts.

Der UV-B-Teil dieser Arbeit wurde unterstützt durch Forschungsmittel des Bundesministeriums für Forschung und Technologie an Prof.Dr.W.Rau.

Lebenslauf

Helga Hofmann, geb. Doll

geboren am: 23. Oktober 1957

Geburtsort: München

Familienstand: seit 11.2.1983 verheiratet mit
Andreas Hofmann

1964-1968 Volksschule in München-Pasing

1968-1977 Neusprachliches Gymnasium in München

1977 Beginn des Studiums der Biologie und
Chemie an der Ludwig-Maximilians-
Universität München

März 1981 Prüfung in Erziehungswissenschaften

März 1983 Wissenschaftliche Prüfung für das
Lehramt an Gymnasien in Biologie
und Chemie

April 1983 Beginn der Dissertation bei Prof.Dr.W.Rau
am Botanischen Institut der Universität
München

Juli 1984 Diplom-Hauptprüfung

Hauptfach: Botanik

Nebenfächer: Zoologie

Organische Chemie

1981-1983 Praktikumsassistentin am Botanischen Institut

seit 1984 Beschäftigung als wissenschaftliche Mitarbeiterin
am Botanischen Institut

